

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA PEDAGOGICKÁ
CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

SCREENING A IDENTIFIKACE BAKTERIOFÁGŮ V
LOKÁLNÍCH POPULACÍCH HLODAVCŮ

TEREZA KOZELKOVÁ

Biologie se zaměřením na vzdělávání

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

Plzeň, 2017

Čestné prohlášení

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

V Plzni, 30. dubna 2017

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a pomoc při zpracování mé kvalifikační práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu, kterou mi poskytují. Rovněž děkuji Zdeňku Švehlovi za jazykovou korekturu.

Strana pro originální zadání bakalářské práce

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Bakteriofágy.....	2
2.1	Životní cyklus.....	3
2.2	Historie výzkumu bakteriofágů.....	6
2.3	Dělení bakteriofágů.....	6
2.3.1	<i>Caudovirales</i>	8
2.3.2	<i>Microviridae</i>	9
2.3.3	<i>Corticoviridae</i>	9
2.3.4	<i>Tectiviridae</i>	9
2.3.5	<i>Leviviridae</i>	9
2.3.6	<i>Cystoviridae</i>	10
2.3.7	<i>Inoviridae</i>	10
2.3.8	<i>Lipothrixviridae</i>	10
2.3.9	<i>Rudiviridae</i>	10
2.3.10	<i>Plasmaviridae</i>	11
2.3.11	<i>Fuselloviridae</i>	11
2.4	Zdroje bakteriofágů.....	11
2.5	Charakteristika živočichů - potenciálních hostitelů bakterií a bakteriofágů	12
2.5.1	Hlodavci.....	12
2.5.2	Rejsek (<i>Sorex</i> sp.).....	13
2.5.3	Klíště (<i>Ixodes</i> sp.).....	14
2.6	Potenciální využití bakteriofágů v léčbě.....	15
2.6.1	Počátky léčby pomocí bakteriofágů.....	15
2.6.2	Možnosti současné bakteriofágové léčby.....	15
3	Materiál a metody.....	17
3.1	Postup při získávání bakteriofágů.....	17
3.1.1	Charakteristika lokalit.....	18
3.2	Izolace DNA.....	18
3.3	Primery.....	19
3.4	PCR.....	20
3.5	Agarozový gel.....	21
3.6	Čištění PCR produktů.....	21

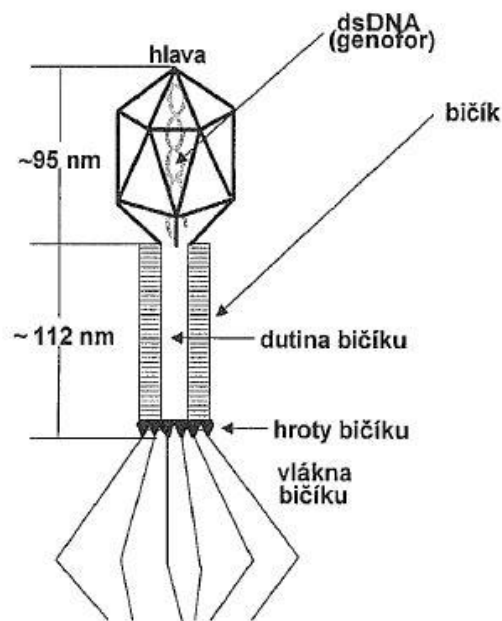
3.7	Sekvenace.....	22
3.8	Vyhodnocení sekvence.....	22
4	Výsledky	23
4.1	Nově nalezené bakteriofágy	24
4.2	Tvorba fylogenetických stromů	25
5	Diskuze	30
5.1	Bakteriofágy a neurodegenerativní choroby	30
5.2	Problematika při získávání čisté bakteriofágové DNA	30
5.3	Porovnání klíšťat a hlodavců.....	31
5.4	Charakteristika fylogenetických stromů	32
5.4.1	Primery Mzia	32
5.4.2	Primery Lav	34
6	Závěr	35
7	Literatura.....	36
7.1	Internetové zdroje.....	43
8	Resumé.....	44
9	Seznam obrázků.....	45
10	Seznam tabulek	45
11	Přílohy.....	46

1 Úvod

Cílem mé práce je screening bakteriálních virů neboli bakteriofágů. Zabývala jsem se hledáním nových bakteriofágů z trusu hlodavců, jako materiálu pro případné medicínské využití. Je totiž známo, že hlodavci jsou přirozenými zdroji bakterií rodu *Borrelia*, tudíž mohou být v jejich organismech přítomny i bakteriální viry (viz Margos a kol. 2011, Burri a kol. 2014, Vostal a Zakovská 2003, Radzijejskaja a kol. 2013, Khanakah a kol. 2006). Práci jsem rozšířila o screening klíštěte (*Ixodes* sp.). Klíšťata jsou dnes velmi známými přenašeči jak bakteriálních, tak i virových infekcí (Papáček a kol. 2000). Rovněž je tedy velká pravděpodobnost přítomnosti bakteriofágů v jejich organismu. Využití bakteriofágů v budoucnosti je zřejmé. Existuje velký potenciál využití fágů v léčbě v kombinaci s antibiotiky (Viertel a kol. 2014). Bakteriofágová terapie se rozvíjela na začátku dvacátého století, s objevením antibiotik však bakteriofágová léčba ustoupila (Fleming 1929, Sulakvelidze a Alavidze 2001). Zatím se příliš neuvažovalo o potenciálním použití bakteriofágů v léčbě neurodegenerativních chorob. Některé neurodegenerativní choroby jsou totiž zřejmě způsobené bakteriálními infekcemi (Miklossy 2011, 2012).

2 Bakteriofágy

Bakteriofágy neboli fág jsou viry napadající bakteriální buňky. Jsou nejrozšířenějšími a nejhojnějšími biologickými objekty na Zemi. Odhaduje se, že existuje 10^{31} druhů bakteriofágů. Největší koncentraci fágů obsahuje zřejmě mořská voda. Hrubá stavba a životní cyklus bakteriofágů jsou relativně dobře známy (Morgan a Pitts 2008). Většina bakteriofágů má specifický tvar. Jejich kapsid je tvořen hlavičkou ve tvaru mnohostěnu, kde je uložena molekula nukleové kyseliny. Dále válcovitý, kontraktilní, dutý bičík, na němž jsou bičíkové hroty a bičíková vlákna. Pomocí těchto bičíkových vláken se bakteriofág zachytí na povrchu hostitelské buňky. Bičík se stáhne a molekula DNA je vypuštěna na principu injekční stříkačky dovnitř bakteriální buňky (Závodská 2006). V tomto stadiu nemají bakteriofágy schopnost pohybu, nedochází u nich k metabolismu či replikaci (Morgan a Pitts 2008). Geneticky jsou bakteriofágy velmi variabilní. Jejich nukleová kyselina může být lineární či cirkulární. Genom se může skládat z dvouřetězcové DNA (ds DNA) nebo jednořetězcové DNA (ss DNA), také z dvou nebo jednořetězcové RNA (ds RNA nebo ss RNA) (Rosypal 2000). Pro jednoduchost jsem se v této práci zaměřila pouze na DNA bakteriofágy.



Obrázek 1- Základní schéma bakteriofága T4.

Zdroj: Rosypal 2000

2.1 Životní cyklus

Jak jsem již výše zmínila, bakteriofágy jsou viry, které pro své rozmnožení potřebují hostitelské buňky, konkrétně buňky bakteriální. Bakteriofágy se množí uvnitř bakteriálních buněk a tímto způsobem může mimo jiné docházet k přenosu genů mezi bakteriemi pomocí virů (Alberts 1998). Životní cykly bakteriofágů můžeme rozdělit na lytické a lyzogenní (Morgan a Pitts 2008) nebo mírné a virulentní (Rosypal 2000). Mírným bakteriofágům můžeme přiřadit životní cyklus lytický a virulentním zase cyklus lyzogenní (Rosypal 2000).

Nehledě na rozdílné životní cykly bakteriofágů, základní kroky infikování buňky zůstávají stejné. V roztoku bakterií se bakteriofágy náhodně pohybují, dokud jejich bičíková vlákna nezachytí specifický bakteriální membránový receptor. Adsorpce viru k hostitelské buňce začíná přilnutím bičíkových vláken k bakteriální buněčné stěně. Bičíkové hroty mají často enzymy, které degradují buněčnou stěnu a umožňují tak proniknutí virové nukleové kyseliny do hostitelské buňky. Do hostitelské buňky proniká pouze virová DNA, ostatní části bakteriofága jako proteinová hlavička, bičík, bičíková vlákna a bičíkové hroty zůstávají připojené k buněčné stěně bakterie. U dalších kroků již záleží, o jaký životní cyklus bakteriofága se jedná. Obecně dochází k expresi a replikaci virové nukleové kyseliny, následně může docházet k skládání a vypouštění nových virionů (Morgan a Pitts 2008).

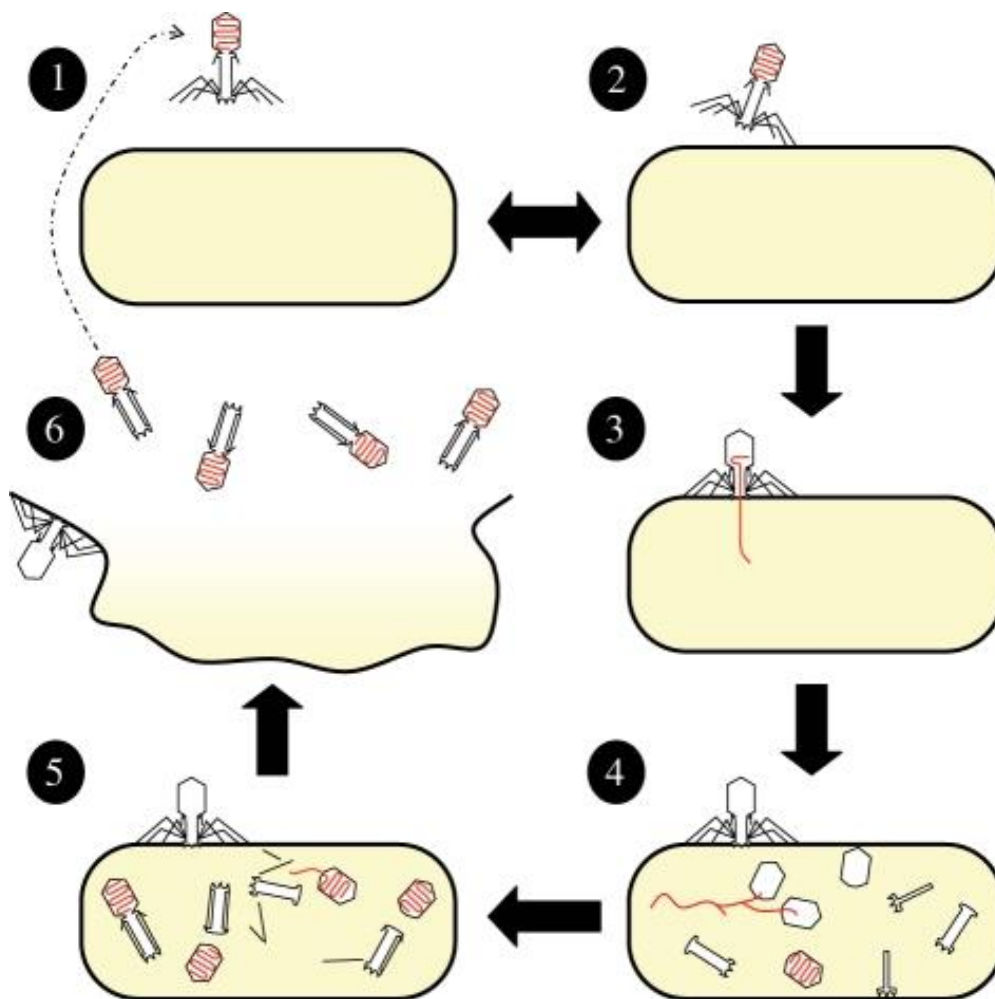
Při lytickém cyklu bakteriofágová DNA proniká do hostitelské buňky, kde dochází k syntéze virových proteinů, potřebných pro tvorbu nových bakteriofágů (Alberts 1998). Virová DNA dokáže přeměnit metabolismus hostitelské buňky tak, aby buňka syntetizovala proteiny pro stavbu nového bakteriofága. Mezi prvními produkty transkripce a translace virového genomu je totiž nukleáza, která degraduje části hostitelské nukleové kyseliny. Virový genetický materiál je tedy syntetizován přednostně. Rovněž dochází k replikaci bakteriofágové DNA a jejímu zabalení do hotového, nového viru. Buňka praská, tento jev nazýváme lyze buňky, a nové bakteriální viry se tak z hostitelské buňky uvolní (Obr. 2). Odhaduje se, že při lytickém cyklu mohou být namnoženy stovky virionů v rámci jedné bakteriální buňky (Morgan a Pitts 2008).

Při lyzogenním cyklu se bakteriofágová DNA integruje do bakteriálního chromosomu. Integrovaná nukleová kyselina bakteriofága se označuje jako profág. Tato část DNA je přítomna v hostitelském chromosomu, aniž by se nějakým způsobem

projevovala na bakteriálním fenotypu. Genom integrované bakteriofágové nukleové kyseliny nemá žádné homologické sekvence s bakteriálním genomem. Nelze se tak integrovat do bakteriálního chromosomu homologní rekombinací. Bakteriofágy využívají místně specifické rekombinace. Virus kóduje integrační enzym integrázu, který rozeznává specifickou sekvenci bakteriálního chromosomu a určitou sekvenci ve virovém genomu. Tyto dvě sekvence integráza přibližuje k sobě, katalyzuje rozštěpení obou nukleových kyselin a jejich opětovné spojení tak, aby byl virový genom integrován do bakteriálního chromosomu. Pokud dochází k množení infikovaných bakteriálních buněk, dochází tak i k přenášení integrované bakteriofágové nukleové kyseliny na budoucí potomstvo. Profágová DNA tak může být donekonečna replikována jako část bakteriálního chromosomu. V případě nepříznivých podmínek, např. vystavení infikovaných hostitelských buněk ultrafialovému záření, je genom profága aktivován (Alberts 1998), nepokračuje dále v produkci represorového proteinu a přechází do lytické fáze životního cyklu (Morgan a Pitts 2008). Tento zlom nazýváme indukční moment. Integrovaná bakteriofágová nukleová kyselina tak nemusí zaniknout spolu s hostitelskou buňkou, ale má šanci uniknout v podobě nově vzniklých bakteriofágů. Při excizi bakteriofágové nukleové kyseliny z hostitelského chromosomu probíhá integrace virové DNA v opačném sledu. Při uvolnění z bakteriálního chromosomu může občas docházet k nepřesnému vystřížení bakteriofágové nukleové kyseliny a to tak, že místo části vlastní DNA je vystřížen i kus DNA bakteriální. Tato bakteriální DNA je zabalena do nového viru společně s bakteriofágovou. Pokud takovýto modifikovaný bakteriofág infikuje novou bakterii, kromě své vlastní nukleové kyseliny vnese do hostitelské buňky i DNA přenesenou z předcházejícího hostitele. V případě, kdy virus nepoškozuje hostitelskou buňku, se může přenášená bakteriální DNA trvale začlenit homologní rekombinací do hostitelského chromosomu. Může tak dojít k přenosu genů mezi bakteriemi. Tento jev se označuje jako transdukce (Alberts 1998).

Díky lyzogennímu životnímu cyklu bakteriofágů může u bakterií nastávat latentní fáze infekce. Bakteriofágová DNA může být zabudována v genomové DNA a při nepříznivých podmínkách dojde k jejímu namnožení a uvolnění virionů z buňky. Bakterie jsou přirozenou i patologickou součástí dalších organismů. Bakteriofágy tedy mohou obsahovat rostliny i živočichové, obsahující zároveň i různé bakterie, které však nenapadají eukaryotické buňky a parazitují jen na buňkách bakteriálních (Závodská 2006, Alberts 1998). Vyšší organismy, například savci, proto mohou šířit bakteriofágy,

kteří parazitují v bakteriích vyskytujících se v organismech savců. Šíří se často pomocí savčích exkrementů. Dobrým zdrojem bakteriofágů jsou proto odpadní vody z nemocnic (viz např. Shen a kol. 2012, Chaudhry a kol. 2014). Bakteriofágy ničí zcela přirozeně bakterie, proto byly a znovu mohou být využity v lékařství pro boj s některými bakteriemi (viz Miedzybrodzki a kol. 2007, Miedzybrodzki a kol. 2009).



Obrázek 2 - Lytický cyklus bakteriofága T4.

Zdroj: upraveno dle Eshelman a kol. 2010

Obr. 2: Náhodný pohyb bakteriofágů v bakteriálním roztoku. Fág je vně své hostitelské buňky (1). Přiblížení bakteriofága k bakterii, adsorpce (2). Dochází k vstříknutí bakteriofágové DNA do hostitelské buňky (3). Syntéza bakteriofágových částí a replikace fágové DNA v cytoplazmě hostitelské bakterie (4,5). Lyze buňky a uvolnění nových bakteriofágů (6).

2.2 Historie výzkumu bakteriofágů

V roce 1896 se věnoval bakterii *Vibrio cholerae* britský bakteriolog Ernest Hanbury Hankin a mezi prvními detekoval aktivitu bakteriofágů (viz Hankin 1896). Fágy jako takové byly objeveny a pojmenovány později. Nezávisle na sobě bakteriofágy objevili britský patolog Frederick William Twortem roku 1915 (Ackermann 2003) a francouzsko-kanadský mikrobiolog Felix d'Herelle v roce 1917. První pozorování bakteriofágů byla francouzsko-kanadskému mikrobiologovi umožněna na základě práce s hospitalizovanými vojáky, kteří trpěli úplavicí (d'Herelle, 1917). Název „bakteriofág“ byl rovněž navržen podle d'Herelleho. Byl odvozen od slov „bacteria“ jako bakterie a „phagein“, což v překladu z řečtiny znamená jíst nebo pohltit. Název má představovat „pojídání“ či „pohlcování“ bakterií bakteriofágy. Objevení bakteriofágů bylo významné nejen pro studii samotných fágů na molekulární úrovni, ale také pro fágovou terapii (viz Sulakvelidze a Alavidze 2001).

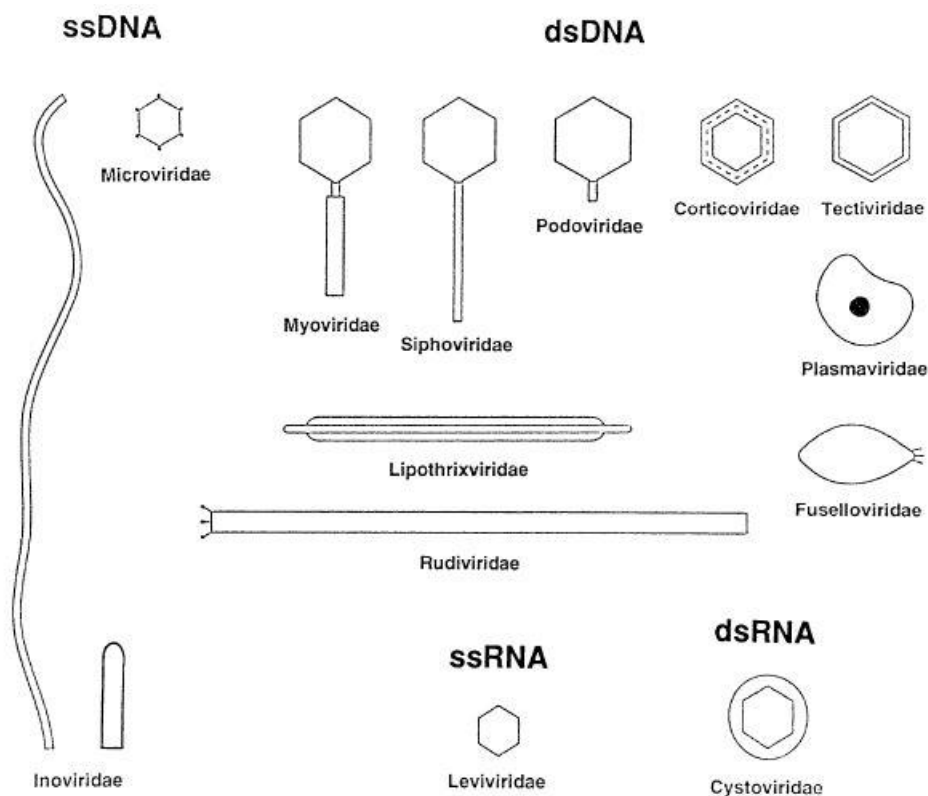
2.3 Dělení bakteriofágů

Fágy jsou klasifikovány do 13 různých rodin. Celkem 5 100 bakteriofágů bylo od roku 1959 analyzováno pod elektronovým mikroskopem. Zhruba 96 % fágů jsou fágy s bičíkem. Polyedrické, vláknité a pleomorfní fágy tvoří méně než 4 % bakteriálních virů. Bakteriofágy se vyskytují u více než 140 rodů bakterií a archeí. Bakteriofágy jsou polyfyletické, což znamená, že opakovaně vznikly z různých předků nebo u různých hostitelů. Bičíkaté fágy se jeví jako nejstarší známá monofyletická skupina virů (Ackermann 2003).

ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses neboli Mezinárodní komise pro taxonomii virů) současně klasifikuje většinu objevených bakteriofágů do řádu *Caudovirales* (bičíkaté bakteriofágy), kam patří čeledi *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae* (Ackermann 2003). Další čeledi již stojí v systému samostatně a neřadí se pod žádný řád. Jsou to konkrétně čeledi *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* a *Cystoviridae*. Do těchto čeledí řadíme mnohostěnné fágy. Dále čeledi vláknitých fágů: *Inoviridae*, *Lipothrixviridae* a *Rudiviridae*. V neposlední řadě čeledi polymorfních fágů: *Plasmaviridae* a *Fuselloviridae* (viz Morgan a Pitts 2008, Ackermann 2003). Podle posledního výzkumu a sčítání bakteriofágů se 4 590 bičíkatých fágů řadí do řádu *Caudovirales* (Ackermann 2003).

Bakteriofágy můžeme mimo jiné rozdělit na základě způsobu infekce bakteriální buňky, tedy dle jejich životních cyklů, na fágy mírné a virulentní (více o tomto rozdělení viz výše kap. „Životní cyklus bakteriofágů“). Další dělení bakteriofágů lze brát podle nukleové kyseliny, kterou obsahují (viz kap. „Úvod“) (Rosypal 2000). Většina fágů obsahuje dsDNA (Ackermann 2003).

Dle Morgana a Pittse je členění bakteriofágů do taxonomických jednotek velmi obtížné, ba i nemožné. Nedávné práce genomiky virů totiž prokázaly velkou rozptřičenost bakteriofágových druhů, pravděpodobně v důsledku horizontálního přenosu genů (HGT - Horizontal gene transfer). S ohledem na tyto výsledky Morgan a Pitts tvrdí, že jakékoliv zařazení bakteriofágů do druhů vždy selhalo. Dále se domnívají, že bakteriofágy jsou nejrozšířenějšími organismy na Zemi, pravděpodobně se schopností se vyvíjet bez formování do druhů (Morgan a Pitts 2008).



Obrázek 3 - Schematická ukázka nukleových kyselin majoritních skupin bakteriofágů.

Zdroj: Ackermann 2003

2.3.1 *Caudovirales*

Bakteriofágy se skládají z hlavičky s kubickou symetrií a ocasu s binární symetrií. Nemají žádný lipidový obal, obvykle se skládají z proteinu a DNA. Jejich nukleová kyselina je z jednoduchého lineárního dvouřetězcového vlákna. Jedná se o velmi rozmanité bakteriofágy, zejména v obsahu a složení DNA, rozměrech bakteriofágů, jejich složení, rozměrů a fyziologie. Některé DNA obsahují neobvyklé báze, jako je 5-hydroxymethylcytosine (Ackermann 2003).

Do čeledi *Myoviridae* se řadí bakteriofágy s kontraktlním bičíkem, který je složen z pochvy a centrální dutiny. Řadíme sem například bakteriofágy T4, P1, P2, Mu atd. (Ackermann 2003). Genom fága T4 je tvořen dsDNA, tedy dvoušroubovicovou lineární DNA. Bakteriofág T4 se množí v buňkách *E. coli*. Po přilnutí bakteriofága k hostitelské bakteriální buňce a vstříknutí dsDNA do buňky nastává pozastavení syntézy hostitelské DNA, RNA a proteinů. Je to jeden z nejvíce prostudovaných bakteriofágů, který zařazujeme do skupiny fágů virulentních (Rosypal 2000). Na skupinu těchto fágů jsem se ve své práci zaměřila. Dvojice primerů Mzia jsou degenerované primery pro získávání bakteriofágů z mořské vody, konkrétně z rodiny T4 fágů (viz kap. „Materiál a metody“) (Filée a kol. 2005).

V čeledi *Siphoviridae* se vyskytují bakteriofágy s dlouhým nestažitelným bičíkem. Dle Ackermannna se do této čeledi zařazují fágy λ , T1, T5, L5, c2, ψ M atd. (Ackermann 2003). Bakteriofág λ je řazen do skupiny mírných fágů. Jeho hostitelskými buňkami jsou bakterie *E. coli*. Lyzogenní kmen *E. coli* nesoucí profága λ se označuje jako *E. coli* (λ^+). Genom fága λ je tvořen dsDNA s kohezními konci. Jako kohezní konce označujeme vzájemně komplementární jednořetězcové 5' konce vyčnívající z dvouřetězcové molekuly DNA, které se mohou párovat (Rosypal 2000). Nukleová kyselina má však lineární tvar jen uvnitř virionů. V hostitelské buňce se nukleová kyselina přemění na tvar kružnicové dsDNA. V tomto tvaru se také v hostitelské buňce replikuje (Rosypal 2000).

V čeledi *Podoviridae* mají bakteriofágy krátký bičík. Řadíme sem bakteriofága T7 (Ackermann 2003), což je další fág, který je pro mou práci jeden z klíčových. Jedna dvojice primerů, kterou jsem použila, konkrétně primery Lav, se zaměřuje právě na fágy z rodiny bakteriofága T7 (viz kap. „Materiál a metody“) (Dwivedi a kol. 2012). Bakteriofága T7 můžeme zařadit do skupiny virulentních fágů. Strategie exprese genomu fága T7 je založena na sledu tří skupin. Geny první skupiny, tj. geny brzké rané

fáze exprese, jsou přepisovány RNA-polymerázou hostitelské buňky na ještě nereplikované fágové DNA. Geny druhé skupiny neboli geny pozdější rané fáze exprese, zahrnují kódující enzymy pro rozklad DNA hostitelské buňky. Mimo jiné rovněž zahrnují geny kódující enzymy potřebné pro replikaci fágové DNA. Do genů třetí skupiny, tj. geny pozdní fáze exprese, se řadí geny kódující proteiny kapsidů (Rosypal 2000). Kromě bakteriofága T7 řadíme do této čeledi bakteriofágy P22, ϕ 29 atd. (Ackermann 2003).

2.3.2 *Microviridae*

Viriony jsou malé, nemají obal. Genom je tvořen kruhovou jednořetězcovou DNA (Obr. 3). Tyto bakteriofágy infikují odlišné hostitele, například čeled' *Enterobacteriaceae* nebo rody *Chlamydia* nebo *Spiroplasma*. Tuto čeled' můžeme rozdělit do čtyř rodů (Ackermann 2003).

2.3.3 *Corticoviridae*

Tato skupina obsahuje zatím jen jeden známý druh a to bakteriofága PM2. Jeho kapsid se skládá ze dvou proteinových skořápek a lipidové dvojvrstvy, která je sevřená mezi nimi. Dva podobné bakteriofágy byly izolovány z mořské vody, zatím ale nebyly podrobně prozkoumány (Ackermann 2003).

2.3.4 *Tectiviridae*

Fágy se skládají z tuhého bílkovinného kapsidu, který obklopuje tlustý, flexibilní lipoproteinový obal. Při adsorpci na hostitelskou buňku se tento váček přemění na bičík o velikosti zhruba 60 nm, pomocí kterého je nukleová kyselina vpuštěna do bakteriální buňky. Přesto, že jsou bakteriofágy z čeledi *Tectiviridae* velmi vzácné, mají poměrně široké spektrum hostitelů *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Thermus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Alicyclobacillus* (Ackermann 2003).

2.3.5 *Leviviridae*

Jsou to ssRNA viry, tedy viry s jednořetězcovou nukleovou kyselinou (Obr. 3). Viriony připomínají spíše poloviriony, jelikož nemají patřičné morfologické náležitosti. Levivirus MS2 nemá žádnou strukturní podobnost proteinového obalu s jinými doposud známými RNA viry. Nejznámější viry z čeledi *Leviviridae* jsou plasmidově specifické

colifágy. Byly rozděleny do dvou rodů sérologicky i na základě jiných kritérií (Ackermann 2003).

2.3.6 *Cystoviridae*

Tato čeleď má oficiálně pouze jednoho zástupce. V poslední době však byla zjištěna podobnost dvou dalších virů k této čeledi. Tyto viry jsou velmi výjimečné mezi bakteriofágy, jelikož obsahují tři molekuly dsRNA a RNA polymerázy. Kapsid je obklopený lipidovým obalem, obsahujícím dodekahedrální RNA polymerásový komplex. Při infikování hostitelské buňky ztrácejí bakteriofágy čeledi *Cystoviridae* svůj lipidový obal a jejich kapsid vstupuje mezi buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu. Jejich hostitelskou buňkou může být pouze *Pseudomonas syringae*, což je fytopatogen (Ackermann 2003).

2.3.7 *Inoviridae*

Čeleď zahrnuje dva rody, *Inovirus* a *Plectrovirus*, které se vyskytují v odlišných hostitelích. Bakteriofágy rodu *Inovirus* se vyskytují v enterobakteriích. Příbuzné druhy se vyskytují například v *Clostridium*. Genom těchto fágů je z hostitelské buňky, která může syntetizovat nové bakteriofágy jen po určitou dobu, vytlačován. Viry jsou citlivé na chloroform, avšak velmi odolné vůči teplu. Tento rod obsahuje 42 fágů, které byly klasifikovány do 29 druhů. Mají dlouhá flexibilní či tuhá vlákna. Do rodu *Plectrovirus* řadíme bakteriofágy s krátkými rovnými bičíky. Vyskytují se pouze u mykoplazmat (Ackermann 2003).

2.3.8 *Lipothrixviridae*

Do této čeledi zahrnujeme viry z rodu *Thermoproteus*. Nové viriony těchto bakteriofágů jsou z hostitelské buňky uvolňovány lyzí buňky (Ackermann 2003).

2.3.9 *Rudiviridae*

Tato čeleď zahrnuje dva bakteriofágy, které byly izolovány z extrémně termofilních archaebakterií. Viry jsou tuhé bez obálky a podobají se viru tabákové mozaiky (Ackermann 2003).

2.3.10 *Plasmaviridae*

Je znám pouze jeden zástupce. Konkrétně *Acholeplasma virus MVL2* nebo L2. Částice nemají kapsid, ale obal a husté nukleoproteinové granule. Pět podobných bakteriofágů bylo nalezeno a izolováno. Nejsou však dost prozkoumané a nelze je zatím s určitostí zařadit do této čeledi. Plasmaviry infikují své hostitele fúzí virového obalu s mykoplazmatickou cytoplazmatickou membránou. Nukleová kyselina je uvolněna vstříknutím (Ackermann 2003).

2.3.11 *Fuselloviridae*

Bakteriofágy obsahují dvouřetězcovou DNA (Obr. 3). V této čeledi je také zatím znám pouze jeden zástupce, bakteriofág SSV1. Bakteriofág se vyskytuje v archaebakterii *Sulfolobus shibatae* jako plazmid a integrovaný profág. Produkci SSV1 je možno indukovat, ale nelze uměle pěstovat, protože neexistuje vhodný kultivovatelný hostitel. Stavba bakteriofága připomíná tvar citronu s krátkými hroty na jedné straně. Obal se skládá ze dvou hydrofobních proteinů a lipidů hostitele. Tento obal lze odbourat chloroformem. Fuselloviry se uvolňují z hostitelské bakteriální buňky vytlačení (Ackermann 2003).

2.4 Zdroje bakteriofágů

Bakteriofágy je možné izolovat zejména z odpadních vod. Často přímo ze vzorků odpadních vod z nemocnic. Poté dochází k filtraci přes filtry, které mají otvory menší než bakterie. Těmito filtry tedy projdou pouze bakteriofágy, které se pak nakapou na kolonie bakterií pěstované na Petriho miskách a pozoruje se, zda kultura bakterií uhynie. V případě, že se tak podaří, je k dispozici nový bakteriofág (Miedzybrodzki a kol. 2009, Jiang a kol. 2011, Shen a kol. 2012, Chaudhry a kol. 2014). Častěji než nakapání bakteriofágů na Petriho misku se používá přelivová metoda pomocí měkkého agaru (viz např. Kudva a kol. 1999).

Je nanejvýš pravděpodobné, že se lytické bakteriofágy vyskytují u savců, kteří jsou přirozenými nositeli rodů *Borrelia*, ačkoliv pro to zatím chybí důkazy. Právě na tyto savce jsem se ve své práci zaměřila a izolovala jsem tak bakteriofágovou DNA. Přirozeným zdrojem rodů *Borrelia*, odkud se klíšťaty šíří na člověka, je několik druhů široce rozšířených hlodavců, např. myšice (*Apodemus* sp.), norník rudý (*Myodes glareolus*), křeček (*Peromyscus* sp.) a hraboš (*Microtus* sp.) (podrobněji viz Margos a

kol. 2011, Burri a kol. 2014, Vostal a Zakovská 2003, Radzijejskaja a kol. 2013, Khanakah a kol. 2006). Hlodavci mohou být chytáni živí pomocí Shermanových pastí (viz kap. „Materiál a metody“). Je možné získávat bakteriofágy z moči, eventuálně výkalů hlodavců (Betts a kol. 2013). V mém případě jsem izolovala fágovou DNA pouze z výkalů či částí tlustého střeva hlodavců (viz kap. „Materiál a metody“). Pro rozšíření a porovnání jsem se dále zaměřila na klíšťata (*Ixodes* sp.). Klíšťata jsou dalším přirozeným zdrojem bakterií rodu *Borrelia*, tudíž jsem předpokládala i výskyt bakteriofágů u některých jedinců.

2.5 Charakteristika živočichů - potenciálních hostitelů bakterií a bakteriofágů

2.5.1 Hlodavci

Jsou to malí, býložraví, semenožraví, případně všežraví savci různého zevního vzhledu, ale jednotné anatomické stavby (Gaisler a Zima 2007). Jsou to malá zvířata s tělem držným při zemi. Na prstech mají drápy, na těle velmi pevnou srst (Jang a kol. 1965). Hlodavci se vyznačují charakteristickou úpravou chrupu s jediným párem horních a dolních řezáků. Řezáky trvale dorůstají a mají sklovinu jen na přední straně, takže se neustále ostře dlátkovitě zbrušují. Místo špičáků mají v chrupu mezeru (diastemu), někdy chybějí i zuby třenové. Stoličky jsou však vždy vytvořeny. Od ostatních placentárních savců se hlodavci odlišují diferenciací jejich žvýkacích svalů. Uspořádání čelistního svalstva je významné pro jejich systematiku (Gaisler a Zima 2007).

Hlodavci se neobyčejně rychle rozmnožují. Mnoho druhů má krátkou graviditu, velký počet mláďat, která rychle dospívají a samice jsou také často schopny páření záhy po porodu (Gaisler a Zima 2007). Za příznivých podmínek bývá u některých druhů 5 i 6 vrhů do roka (Jang a kol. 1965). Hlodavci jsou známí z fosilního záznamu z počátku třetihor (*Ischyromyidae*), ale kořeny jejich linie mohou sahát až do druhohor. Hlodavci jsou vývojově progresivní skupinou. Došlo u nich k rozsáhlejší přestavbě genomu než u jiných srovnatelných savců nebo obratlovců. To naznačuje vysoké tempo evoluce vůbec (Gaisler a Zima 2007).

Hlodavci jsou druhově nejpočetnějším řádem žijících savců, který obsahuje 2 277 v současnosti uznávaných druhů (Gaisler a Zima 2007), je to skupina velmi dobře vymezená jako snad žádný jiný řád savců (Jang a kol. 1965). Hlodavci osídlili celý svět

kromě Antarktidy a obsadili rozmanité ekologické niky od podzemních, zemních a polovodních až po stromové. Žijí také od tropických deštných lesů až po vrcholky hor a tundru (Gaisler a Zima 2007).

Hlodavci jsou významnými přenašeči nebo rezervoáry různých onemocnění. Mnozí jsou přirozenými hostiteli parazitických druhů hmyzu a klíšťat, a tedy přirozenými rezervoáry zvířaty četných nakažlivých chorob (skvrnivky, leptospirózy, encefalitidy, boreliózy, moru aj.) i četných epizoocí, které jsou přenosné na člověka, např. tularémie. Hlodavci mají značný podíl na trvalosti ohnisek těchto nemocí (Jang a kol. 1965). Někteří hlodavci jsou nejvýznamnějšími modely jakožto laboratorní zvířata v biologických a medicínských výzkumech (Gaisler a Zima 2007).

2.5.1.1 Hraboš (*Mycrotus* sp.)

Hraboše řadíme do čeledi myšovití (Muridae), což je velmi rozmanitá skupina s více než 1 300 druhy (Gaisler a Zima 2007). Je to náš nejhojnější hlodavec. Hraboši jsou asi 10 cm dlouzí, ocas dosahuje délky 35-45 mm. Srst mají hrubou, rezavě žlutohnědou, na břišní straně šedobílou se žlutým nádechem. Ušní boltce mají poměrně krátké (Jang a kol. 1965). Při přemnožení, které se opakuje v poměrně krátkých intervalech, dosahují populační hustoty až kolem 1 000 jedinců na hektar. Na jaře, po zlomu početnosti, naopak připadá 1 jedinec na 2-5 hektarů (Gaisler a Zima 2007). Hraboši žijí na otevřených polích, lukách a pastvinách (Jang a kol. 1965).

2.5.1.2 Myšice (*Apodemus* sp.)

Myšice rodu *Apodemus* jsou nejhojnějšími volně žijícími příslušníky čeledi Muridae u nás (Gaisler a Zima 2007). Myšice se vyznačují nápadně dlouhými ušními boltci a dlouhým ocasem. Žijí na lokalitách, kde jsou rozšířena též klíšťata - tedy v ohniscích klíšťových onemocnění. Myšice mohou být tedy zprostředkovateli přenosu těchto chorob na synantropní hlodavce (Jang a kol. 1965).

2.5.2 Rejsek (*Sorex* sp.)

Řadí se nikoliv do řádu hlodavců, ale do řádu hmyzožravců (Eulipotyphla), do čeledi rejskovitých (Soridacae). Jsou to malí hmyzožravci s nízkou protáhlou lebkou bez jařmových oblouků (Gaisler a Zima 2007).

2.5.3 Klíště (*Ixodes* sp.)

Klíšťata jsou nejznámější skupinou roztočů (Acarina) čeledi Ixodidae (Papáček a kol. 2000, Volf a Horák 2007). Na hřbetě mají dospělá klíšťata typický tvrdý štítek (scutum). U samců štítek zakrývá téměř celé tělo, u samic pak v nenasátém stavu zasahuje pouze do poloviny či třetiny. Tělo klíštěte dělíme na idiosoma a gnathosoma, jenž vyčnívá z obrysu těla a je vybavena typickým ústním ústrojím. Klíště se ukotvuje na svého hostitele pomocí hypostomu. Životní cyklus klíštěte můžeme rozdělit do tří částí: nymfa, larva, dospělec. Každé stadium potřebuje ke svému vývoji zpravidla jeden rok. Takže celý vývoj klíštěte trvá obvykle tři roky. U klíštěte mluvíme o tříhostitelském cyklu. Řada klíšťat totiž potřebuje ke svému vývoji tři různé hostitele. Larvy sají na drobných hlodavcích, ptácích nebo ještěrkách podobně jako nymfy, které však vyhledávají i větší obratlovce. Dospělé samičky pak napadají především větší lesní zvěř, mohou však parazitovat i na člověku. Tento aspekt vývojového cyklu je velmi důležitý z hlediska přenosu různých nemocí. Hladová klíšťata zaznamenávají svého hostitele prostřednictvím citlivého Hallerova orgánu, což je jamka se smyslovými brvami vnímajícími teplo, CO₂ a další chemické sloučeniny (Volf a Horák 2007).

Klíšťata se u nás vyskytují především v listnatých a smíšených lesích s křovinatým podrostem (Volf a Horák 2007). Jejich nebezpečnost spočívá zejména ve schopnosti přenosu virů, způsobujících klíšťovou encefalitidu, nebo bakterií rodu *Borrelia*, které způsobují vážné metabolické onemocnění - lymeskou boreliózu. Přírodním ohniskem těchto virů a bakterií jsou drobní hlodavci. Larvy či nymfy klíšťat sají právě na těchto drobných hlodavcích a tak mohou s nasátou krví nasát i některé viry či bakterie (Papáček a kol. 2000). Původcem lymeské boreliózy jsou bakterie z komplexu druhů *Borrelia*. U většiny lidských případů výskytu boreliózy se v místě sání dva až tři týdny po infekci objeví na kůži postupně se zvětšující skvrna, která je ve své střední části světlá a na okrajích pak zarudlá (tzv. erythema migrans) (Volf a Horák 2007). Zatímco proti klíšťové encefalitidě je k dispozici účinné očkování, v případě lymeské boreliózy je situace složitější. V Evropě se vyskytuje celý komplex druhů *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garini*. Vakcína vyvinutá pro Severní Ameriku proto není v Evropě dostatečně účinná. Evropská vakcína je dosud ve stadiu vývoje a testování (Volf a Horák 2007). Klíšťata mohou také přenášet *Anaplasma* (dříve *Ehrlichia*), která může způsobovat bolesti hlavy, horečky, zvýšení hodnoty jaterních enzymů či neurologické problémy (Ismail a kol. 2010).

V následující kapitole: „Potenciální využití bakteriofágů v léčbě“ dále rozvádím tuto problematiku a navrhuji případné použití bakteriofágové terapie k léčbě některých chorob, zejména lymeské boreliózy.

2.6 Potenciální využití bakteriofágů v léčbě

V současnosti je velmi často zmiňována léčba pomocí bakteriofágů. Tento typ léčby se ale jen zřídka provádí v lékařské praxi. Léčba bakteriofágy, či fágovými prepalytickými enzymy (enzymy, které rozkládají bakteriální buněčnou stěnu) by však někdy mohla být mnohem účinnější než léčba klasickými antibiotiky. Současně totiž globálně roste počet bakteriálních kmenů u zvířat i lidí, rezistentních vůči antibiotikům. Dále se neustále zvyšují požadavky na bezpečnost potravin, kde je nyní nepřijatelná zbytková toxicita antibiotik (Tiwari a kol. 2014).

2.6.1 Počátky léčby pomocí bakteriofágů

Netrvalo dlouho a po objevu bakteriofágů d'Herelle začal používat objevené fágy k léčbě, a to terapeuticky. Konkrétně léčil pacienty trpící úplavicí. Jeho první pacient byl dvanáctiletý chlapec. Hned po prvním podání se chlapcovy příznaky značně zlepšily a k úplnému uzdravení pacienta došlo během několika následujících dní. Účinnost bakteriofágů byla zanedlouho potvrzena na dalších pacientech trpících rovněž bakteriální úplavicí. Výsledky těchto studií však nebyly okamžitě publikovány. První aplikace bakteriofágů byla zaznamenána Richardem Bruynoghem a Josephem Maisinem v roce 1921. Fágy použili v léčbě proti stafylokokové kožní nemoci. Autoři uvádějí regresi infekce během 24-48 hodin (viz Sulakvelidze a Alavidze 2001). V roce 1928 byl však objeven *Penicilin* sirem Alexanderem Flemिंगem a nastala tak nová éra v léčení bakteriálních onemocnění, a to pomocí antibiotik (Fleming 1929).

2.6.2 Možnosti současné bakteriofágové léčby

Podle nedávných poznatků se zdá, že dlouhodobá chronická spirochetální infekce způsobuje vážné neurologické poruchy a neurodegenerativní onemocnění, jako např. Alzheimerova choroba (Miklossy 2011, 2012). Nejsou současně vyloučena ani některá další onemocnění, jako roztroušená skleróza, amyotrofická laterální skleróza či Parkinsonova choroba apod. (Halperin 2011). Návrhy na léčbu Alzheimerovy choroby

pomocí bakteriofágů se objevují nejen v internetových diskuzích, ale i v seriózních pracích (viz Dezfulian a kol. 2008, Sohrab a kol. 2014).

I když je fágová terapie navrhována, nejsou příliš detailně probírány postupy, jak konkrétně terapii provádět. Klíčové je nalezení vhodných bakteriofágů. Nejvhodnější je se v případě neurodegenerativních chorob zaměřit v první fázi na bakterie rodu *Borrelia*. Konkrétně na evropské a americké druhy, u kterých je potvrzeno nebo je podezření na vyvolání lymeské boreliózy. Konkrétně se jedná o druhy: *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. andersonii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. baronii*, *B. spielmanii* (Margos a kol. 2011). U rodu *Borrelia* se bakteriofágy přirozeně vyskytují. Již v roce 1983 a v roce 1999 byla jejich existence prokázána (Hayes a kol. 1983, Eggers a Samuels 1999). Některé fágy byly využity jako modelové objekty při studiu sbalování, transdukce DNA a mechanismu pro přenos genů (Eggers a kol. 2001). Je prokázáno, že u *Borrelia burgdorferi* existují fágy i v bakteriálním genomu ve formě profágů (Babb a kol. 2006). Je tedy pravděpodobné, že existuje škála bakteriofágů, napadajících rod *Borrelia*. Některé by tudíž mohly být využitelné pro léčbu. Jako terapeutický prostředek v eliminaci gram-pozitivních patogenů se osvědčilo použití enzymů získaných z fágů, jako je např. endolysin (Viertel a kol. 2014). Fágové prepalytické enzymy schopné lyze u *Borrelia burgdorferi* a příbuzných druhů (Margos a kol. 2011) by mohly posloužit k potlačení některých typů Alzheimerovy choroby. Nemělo by však dojít ke komplexnímu odstranění léčby pomocí antibiotik. Léčba pomocí fágů i antibiotik současně, snižuje signifikantně množství bakteriálních patogenů (Viertel a kol. 2014).

Je zřejmé, že bakteriofágy proti *Borrelia burgdorferi* mohou vyřešit pouze některé neurodegenerativní nemoci, které jsou zapříčiněné jen tímto druhem. Je nutno mít bakteriofágy i proti dalším druhům rodu *Borrelia* a dalším spirochétám a jiným kmenům, které také zapříčiňují neurodegenerativní onemocnění. Konečným cílem by mělo být vytvoření fágového preparátu, který by obsahoval ať už více různých typů fágových prepalytických enzymů nebo přímo samotných fágů, schopných zacílit celou škálu bakteriálních rodů, zejména *Borrelia*, *Chlamydia*, *Treponemas*. Případně i jiných dosud neuvažovaných kmenů, které bude nutno teprve identifikovat. U dalších kmenů je možno postupovat obdobně. U kmene *Chlamydia* je známa už celá řada bakteriofágů (Śliwa-Dominiak 2013). Že by šlo zřejmě léčit Alzheimerovu chorobu vyvolanou *Chlamydia pneumoniae* pomocí dvou fágů phiCPAR39 a příbuzného fága phiCPG1,

bylo navrhováno už v roce 2008 (Dezfulian a kol. 2008). Jako zdroj dalších fágů mohou sloužit jak lidé, tak i zvířecí druhy (papoušci, křečci, myši a kočky), které nejsou sice vždy nositelé druhů napadajících člověka, ale je pravděpodobné, že jejich bakteriofágy mohou napadat i blízce příbuzné druhy, které jsou pro lidi infekční. U rodu *Treponema* je znalostí ohledně jejich bakteriofágů zatím málo. Existence fágů je však i zde prokázána (Mitchell 2010). Likvidace těchto bakteriálních kmenů v napadeném lidském mozku by s velkou pravděpodobností zastavila degenerativní změny popisované jako Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza, Parkinsonova choroba apod. (viz Halperin 2011) a umožnila by postupnou obnovu mozkové tkáně. Podle účinku by se preparát mohl používat samostatně, nebo v kombinaci s vhodnými antibiotiky.

3 Materiál a metody

3.1 Postup při získávání bakteriofágů

Hlavním zdrojem bakteriofágů pro tuto práci jsou hlodavci a klíšťata, kteří jsou nositeli nebezpečných bakterií zvláště rodu *Borrelia*. Pro potřeby práce jsem se zaměřila především na myšice a hraboše, a to pro jejich dostupnost v lokalitách, kde byla možnost získání relevantních vzorků. Sběr hlodavců jsem prováděla pomocí speciálních Shermanových pastí, tzv. „živochytek“. Odchyt hlodavců byl uskutečněn v souladu se zákonem 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání (Příloha 1). Shermanovy pasti umožňují odchyt živých zvířat a následně opětovné puštění do přírody. Do pastí byla vkládána návnada. Po odchycení živého zvířete v pasti jsem odebrala trus, který obvykle v pasti zůstal. Dále jsem hlodavce získávala jako kořist kočky domácí. Fotografie některých úlovků kočky domácí uvádím v Příloze 2. Trus z mrtvého zvířete jsem získávala z tlustého střeva jednoduchou pitvou, kterou jsem prováděla ve sterilních rukavicích. Řez byl prováděn sterilní žiletkou, která byla sterilizována ethanolem. Vzorek tlustého střeva jsem následně vložila pinzetou do plastické zkumavky (eppendorf), kterou jsem příslušně označila. Určení a zařazení hlodavců do rodu jsem prováděla pomocí příručky „Poznáváme naše savce“ (Anděra a Horáček 2005). Současně jsem pro porovnání provedla i screening klíšťat, které byly sbírány pomocí vlajkování a na domácích zvířatech (psi, kočka). Vlajkování je velmi stará metoda sběru klíšťat, ale i jiných roztočů. Použije se dřevěná tyč, na kterou je zavěšen kus látky přibližně 1 x 1 m (viz Guifoile, 2014). V mém případě jsem použila bílé bavlněné prostěradlo, na kterém byla tmavá klíšťata dobře viditelná. Klíšťata byla následně

sebrána ze světlé tkaniny do plastové zkumavky (eppendorf). Tuto zkumavku jsem označila datem a lokalitou.

3.1.1 Charakteristika lokalit

Odběr živočichů jsem prováděla celkem na třech lokalitách: Losiná – okres Plzeň-město, Jankov – okres České Budějovice, Čerňovice – okres Plzeň-sever (Příloha 3).

Klíšťata jsou v okrese České Budějovice běžná. Odhad výskytu případů klíšťové encefalitidy v lokalitě Jankov – okres České Budějovice je vysoká až velmi vysoká, což znamená 3-5,9 nakažených na 1 000 obyvatel. Výskyt lymeské boreliózy je rovněž na stupni vysokém až velmi vysokém [1]. V okrese Plzeň-město a Plzeň-sever není známo tak vysoké procento nakažených klíšťat. Udává se okolo 10 % klíšťat přenášejících lymeskou boreliózu a okolo 3 % klíšťat přenášejících klíšťovou encefalitidu [2].

Na odchytových lokalitách je výskyt hrabošů i myšic stálý [3].

3.2 Izolace DNA

DNA byla izolována klasickou fenol-chloroformovou metodou (Green a Sambrook 2012). Homogenizace byla prováděna měděným homogenizátorem vlastní výroby. Sterilizaci jsem prováděla žíháním a následným chlazením v ethanolu. Zároveň je u tohoto homogenizátoru výhoda, že jeden homogenizátor lze sterilizovat opakovaně v krátkém časovém intervalu na rozdíl od běžných teflonových homogenizátorů, které se používají na jednorázové sterilizování a následně se musí sterilizovat v tlakovém hrnci či sterilizátoru. Do plastové zkumavky (eppendorf) 1,5 ml bylo přidáno malé množství sterilního písku a 500 μ l destilované vody. Vzorek jsem rovnoměrnými pohyby homogenizátorem zcela rozdrtila. V případě klíštěte jsem do plastové zkumavky vložila a následně rozdrtila celého jedince. Písek byl předem sterilizován v tlakovém hrnci.

Při vlastní izolaci DNA se v prvním kroku do již rozdrčeného vzorku s destilovanou vodou přidal fenol (500 μ l) a chloroform (500 μ l). Poté jsem provedla silné třepání na třepáče Vortex po dobu 3 minut. Třepání ve fenol-chloroformu umožňuje separaci DNA od proteinů a dalších částí tkání. Proteiny zůstanou na hranici vodné fáze a fenol-chloroformové fáze, zatímco DNA je rozpuštěna ve vodné fázi (Green a Sambrook 2012). Dále jsem plastové zkumavky vložila do centrifugy.

Centrifugace probíhala po dobu 10 minut, při rychlosti 1 200 rpm (9 500 g). Poté jsem ze zkumavek odebrala pipetou horní vodnou fázi, kterou jsem přepipetovala do nových označených plastových zkumavek. Při každém kroku bylo nutno měnit špičku na automatické pipetě, abych zabránila možné kontaminaci. Stejný postup s fenol-chloroformem jsem ještě jednou zopakovala. V třetím kroku jsem použila místo fenol-chloroformu pouze odpovídající množství chloroformu k již získanému množství vodné fáze. Po opětovném třepání a centrifugaci (stejně jako v předchozích krocích) jsem opět odebrala horní vodnou fázi a odhadla objem této fáze (při opakovaném odebrání vodné fáze dochází k určitým ztrátám). Množství jsem odhadla díky kalibrovaným plastovým zkumavkám (eppendorf). K takto získané vodné fázi jsem přidala desetinu objemu 5M octanu sodného (CH_3COONa). Pro vysrážení získané DNA byl použit čistý 96% ethanol, který jsem přidala v poměru 2,5x větším, než byl objem v plastové zkumavce (vodná fáze + 5M octan sodný). Vzorky jsem ponechala po 24 hodin v mrazicím boxu při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Po vyjmutí z mrazicího boxu byla provedena centrifugace 1 200 rpm (9 500 g) po dobu 10 minut. Poté jsem odebrala horní ethanolovou fázi, kterou jsem již dále nepotřebovala. Na dně plastové zkumavky byla vidět bílá nebo hnědá sraženina, což byla převážně vlastní DNA. Tuto sraženinu jsem promývala čistým 75% ethanolem. Následně jsem vzorky opět centrifugovala 7 minut při 1 200 rpm (9 500 g). Odstranila jsem 75% ethanol pipetováním, na dně zkumavky opět zůstala vysrážená DNA. Poté jsem vysoušela zbytky ethanolu na vzduchu. Vysoušení je velmi citlivé, protože vzorek nesmí být vysušen zcela, došlo by tak k poškození DNA. Dále bylo ke vzorku přidáno 50 μl elučního pufu (Nucleo Spin). Poté byly vzorky připraveny pro PCR reakci. Vzorky je možné před samotnou PCR reakcí uchovávat, a to ve $4\text{ }^\circ\text{C}$, ne však po příliš dlouhou dobu. Vzorky by se neměly ukládat do mrazicího boxu, jelikož opakované rozmrazování a zamrazování může způsobit poškození dlouhých řetězců genomové DNA (Green a Sambrook 2012).

3.3 Primery

Byla upravena metoda, vytvořená pro získávání bakteriofágů z mořské vody z rodiny T4 fágů, odkud byly převzaty primery nazvané Mzia1bis (5'-GATATTTGIGGIGTTCAGCCCIATGA-3') a Mzia6 (5'-CGCGGTTGATTTCCAGCATGATTTTC-3'). Tyto primery amplifikují gen T4 G23, který je přítomen u všech bakteriofágů z rodiny T4 (Filée a kol. 2005). Současně jsem

použila i další primery, vytvořené aplikací PhiSiGns, která identifikuje specifické a charakteristické sekvence genů pro kmeny bakteriofágů a provádí design sekvence DNA oligonukleotidů. Tyto DNA oligonukleotidy jsou využitelné jako primery pro PCR reakce (Dwivedi a kol. 2012). Byla použita dvojice primerů navrhovaná v této studii (viz Dwivedi a kol. 2012), pro identifikaci fágů příbuzných bakteriofágu T7. Pracovně jsem je nazvala Lav1 (5'-ACHGARGGYGARATHG-3') a Lav 2 (5'-CVCCTTGYTGRTTDC-3'), protože Dwivedi a kol. je navrhli na základě podkladů získaných z Lavigneho práce (Lavigne a kol. 2008). Bakteriofágy patřící do rodiny T7 fágů se vyskytují jako *Enterobacteria phage T7*, *Enterobacteria phage T3*, *Enterobacteria phage K1F*, *Yersinia pestis phage phiA1122*, *Yersinia phage Berlin*, *Yersinia phage phiYeO3-12*, *Vibriophage VP4* and *Pseudomonas phage gh-1* (viz Lavigne a kol. 2008). Obě dvojice primerů obsahují speciální nespécifické báze, které umožňují amplifikaci DNA z širokého spektra odlišných bakteriofágů. Obě dvojice tohoto typu primerů se označují jako degenerované (angl. degenerate primers) (Filée a kol. 2005, Lavigne a kol. 2008).

3.4 PCR

Před PCR reakcí s Mzia primery bylo nutné provést mnohonásobné ředění. Provedla jsem celkem 20 ředících řad po 10 μ l vždy do 200 μ l destilované vody, jinak by došlo k namnožení DNA z více druhů fágů, sice různých sekvencí, ale ve stejně dlouhém úseku, což představuje zásadní problém pro sekvenační reakci. Ředění bylo prováděno v termobloku při 95 °C, aby došlo k oddělení řetězců DNA, různých bakteriofágů, které mohly částečně hybridizovat (Wang a kol. 2014, Palumbi a kol. 2002).

Pro PCR reakci s Mzia primery pro rodinu T4 bakteriofágů byly použity následující podmínky: první fáze iniciační denaturace 94 °C po dobu 90 sekund, dalších 35 cyklů byla denaturace 94 °C po dobu 45 sekund, anelační teplota 50 °C, 1 minutu, extenze v 72 °C, 45 sekund a konečná fáze extenze 72 °C po dobu 5 minut (viz Filée a kol. 2005).

Pro PCR reakce s degenerovanými primery pro rodinu T7 fágů (Lav 1,2) byly použity tyto reakční podmínky: první fáze iniciační denaturace 94 °C, 5 minut, dalších 35 cyklů byla denaturace 94 °C po dobu 1 minuty, anelační teplota 51,1 °C - 0,5 °C/na

cyklus po dobu 1 minuty, extenze v 72 °C, 2 minuty, a konečná fáze extenze 72 °C po dobu 10 minut (Dwivedi a kol. 2012).

3.5 Agarozový gel

Produkty PCR reakce byly vizualizovány na 2% agarozovém gelu v TAE pufru (Tris-acetate-EDTA). Byla použita elektroforéza (Consort) při 100 V po dobu 60 minut. Gel jsem připravovala z 2% agarozy (Serva), a to navážením 1 g agarozy do 50 ml TAE pufru. Dále jsem směs vařila v mikrovlnné troubě do vyjasnění roztoku 2% agarozy s TAE pufrem. Po mírném zchladnutí jsem tento roztok nalila do agarozové vaničky, ve které byl umístěn tzv. hřeben. Tento hřeben do gelu vytvoří jamky (angl. wells). Po utuhnutí, přibližně za 20 minut, jsem vyjmula opatrně hřeben, umístila gel do elektroforézy a přelila TAE pufrem. Poté jsem do jamek napipetovala vzorky po PCR reakci a současně do jedné tzv. ladder (marker), ve kterém jsou nadefinované DNA fragmenty o určitých velikostech 50 - 1 350 bp.

3.6 Čištění PCR produktů

Při čištění PCR byla použita klasická metoda vyřezání pruhu s příslušnou DNA z agarozového gelu (Green a Sambrook 2012). Metod je celá škála, v této práci jsem DNA v gelu doplnila elučním pufrem (Nucleo Spin) v poměru 3:1 k objemu gelu. Pak byl gel v plastické zkumavce rozdrcen měděným homogenizátorem a zahříván na teplotu 65 °C po dobu 10 minut. Následně byly vzorky zmrazeny na teplotu -20 °C v mrazicím boxu po dobu 20 min. Vhodnější by bylo zmrazit vzorky na teplotu -70 °C, tento mrazicí box jsem však neměla k dispozici. Dále byly vzorky podrobeny centrifugaci 1 200 rpm (9 500 g) po dobu 10 minut. Tento postup byl dvakrát opakován. Následně bylo možno odebrat eluční pufr s DNA.

V této práci byla pro produkty Lav 1 a Lav 2 primerů použita metoda dvojího čištění na agarozovém gelu (dvakrát PCR a řezání z gelu). Pro čištění produktu PCR reakce byl taktéž použit 10% akrylamidový gel. Po PCR reakci z jednoho vzorku se na gelu mnohdy objevilo více pruhů. Každý pruh zřejmě představoval namnoženou DNA z jednoho druhu bakteriofága. V těchto pruzích však zřejmě byly obsaženy i příměsi dalších druhů bakteriofágů. Snad v důsledku částečné hybridizace (Wang a kol. 2014, Palumbi a kol. 2002). Celý tento problém znemožňoval sekvenaci. Pro odstranění tohoto problému byla použita denaturace PCR produktu při 95 °C po dobu 5 minut a

okamžitá separace v novém zahřátém 2% agarozovém gelu. Tímto způsobem došlo k oddělení příměsí. Opětovné vyřezání a čištění přineslo čistou DNA z jednoho druhu bakteriofága, kterou již bylo možno sekvenovat.

Obdobným způsobem byly čištěny i produkty PCR reakce s Mzia primery s nařaděnou genomovou DNA.

3.7 Sekvence

Sekvenaci prováděla firma BioGen [4], (Ke sv. Isidoru 2293/4a, 149 00 Praha 4-Chodov) a to Sangerovou metodou. Sangerova metoda využívá přirozeného procesu replikace DNA. Dá se tedy opět využít PCR reakce. Sekvence se vloží do reakční směsi, která v původní verzi obsahovala vhodně radioaktivně označený primer (α -P³²-dATP) volné nukleotidy (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), nyní se přidávají fluorescenční barviva navázaná na jednotlivé nukleotidy. V reakci je nutná přítomnost ještě jednoho druhu nukleotidu, který neobsahuje OH skupinu, na kterou by se mohl navázat další nukleotid. Reakce se provádí čtyřikrát s pokaždé jiným upraveným nukleotidem, který je přítomen vedle normálních s OH skupinou. Díky tomu vznikají různě dlouhé sekvence v pořadí, kdy každá značí příslušný nukleotid v původní sekvenci (viz Sanger a Coulson 1978, Smith a kol. 1986).

3.8 Vyhodnocení sekvence

Sekvence byla analyzována na webových stránkách NCBI (The National Center for Biotechnology), kde jsem sekvence porovnávala s již známými sekvencemi bakteriofága T7 nebo bakteriofága T4 [5].

Vytváření fylogenetických stromů jsem prováděla v programu Mega7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [6]. V tomto programu jsem analýzu fylogenetických stromů prováděla pomocí dvou metod. Metoda maximální věrohodnosti (angl. The Maximum Likelihood) (viz Tamura a Nei 1993, Kumar a kol. 2016). Druhá metoda nazvaná Neighbor-joining (viz Saitou a Nei 1987, Tamura a kol. 2004, Kumar a kol. 2016).

Pro alignment neboli srovnání sekvencí jsem použila online program Institut de Génétique Humaine, 141 rue de la Cardonille, Montpellier, France [7].

4 Výsledky

Při práci jsem se potýkala s problémem, kdy jsem měla ve vzorku více druhů bakteriofágů, čili více řetězců DNA. Pokud jsou ve vzorku pro Sangerovu metodu různé sekvence, metoda obtížně detekuje sekvenci jednotlivých řetězců. Ve výsledku pak vzniká nečitelný chaos. V Tabulce 1 uvádím veškerý přehled všech vzorků, a zda se podařilo amplifikovat bakteriofágovou DNA, či nikoliv, nehledě na úspěšnost při sekvenování. V Tabulce 2 uvádím vzorky, které se podařilo vyčistit a následně sekvenovat. Uvádím zde i názvy nově objevených bakteriofágů.

Vzorky s označením A1, A2, B, C1, C2, C3, C4, D, I1, I2, J obsahovaly trus či kus střeva hrabošů (*Microtus* sp.) (Tab. 1). Největším přínosem pro mou práci byl vzorek C4, jelikož jsem namnožila bakteriofágovou DNA jak s primerem Lav (Obr. 4), tak i s primerem Mzia (Obr. 6). Ve vzorku jsem identifikovala čtyři nové bakteriofágy. Na Obr. 7 pro příklad uvádím graf sekvence (sekvenogram) bakteriofága WhisL1 ze sekvenování Sangerovou metodou. Zřejmě však v tomto vzorku bylo přítomno bakteriofágů více (Obr. 5). Sběr hrabošů jsem prováděla ve všech třech lokalitách (viz kap. „Materiál a metody“), avšak jen v Losiné, okres Plzeň-město a v Jankově, okres České Budějovice jsem byla úspěšná. Pozitivní vzorky na fágy byly pouze v lokalitě Losiná, okres Plzeň-město. Další pozitivní vzorky s primery Mzia i Lav byly I1 a I2. Vzorky C1, C2, C3 byly pozitivní pouze s primerem Lav, ale nebylo možné je dále sekvenovat i po čištění z gelu. U vzorku D jsem amplifikovala fágovou DNA pouze s primerem Mzia, s primerem Lav nikoliv (Obr. 4).

Vzorky s označením E1, E2, F, G, L, M, N, P (Tab. 1) obsahovaly substrát z myšice (*Apodemus* sp.). Odchyt myšic jsem provedla na všech třech lokalitách (viz kap. „Materiál a metody“). U vzorku N se mi podařilo namnožit fágovou DNA s primerem Lav. DNA však nebylo dále možné sekvenovat. U vzorků E1, E2, F, G se bakteriofágová DNA nepodařila amplifikovat.

Pokusně byl otestován také rejsek (*Sorex* sp.), vzorek s označením CH (Tab. 1). Žádné bakteriofágy jsem zde neamplifikovala.

Dále jsem prováděla namnožení bakteriofágové DNA z organismu klíštěte (*Ixodes* sp.). Konkrétně vzorky s označením H1, H2, H3, H4, K, a O (Tab. 1). Vlajkování či sběr klíšťat na domácích zvířatech (pes, kočka) jsem prováděla na všech třech lokalitách (viz kap. „Materiál a metody“). U vzorků s označením H1 - H4 jsem amplifikovala fágovou DNA primery Mzia (Obr. 4), s primery Lav nikoliv. U vzorku O

to bylo právě naopak. U tohoto vzorku se podařilo bakteriofágovou DNA sekvenovat (Tab. 2). Vzorek H4 se mi rovněž podařilo sekvenovat a našla jsem nový druh bakteriofága (Tab. 2).

4.1 Nově nalezené bakteriofágy

Ze vzorku C4 jsem po vyřezání z gelu (Obr. 4) provedla čištění s každým jednotlivě vyříznutým pruhem (A, B, C, E). Fágovou DNA z jednotlivých pruhů jsem denaturovala při 95 °C a opět pustila za horka na gelu (Obr. 5). Níže uvádím sekvence jednotlivých bakteriofágů a jejich pojmenování.

Bakteriofág WhisL1 (vzorek C4 - pruh E):

```
AGAGAACCAGTGAGTACCATACGTATGCGGTGATATCATTGTTGAAACCCG
CTATGACGGCAACGGTGACCCATACGATTGGTACGTCCTGCAAACCACGCT
GACAGTCACGCCGCTGTCCACCATCATTTTCAGGCAGTCTGGCCCCCGGTGAG
CAGACCGACCGGTACAGCGTATAACCAGCAGACCCTCGGCAACCAACAAGGG
GA
```

Bakteriofág WhisL2 (vzorek C4 - pruh B):

```
AAGGTTCTGACGGGACAGGCAGACCGCGTCCGTCTCGGATTGATCGGTGAG
GAGCCTCTCCCGATGCGGACGGCACTCCGAACGGCACGGATATGTCCCGTG
TCGCTGTTGTGCGCGCTGCCTGCGGCATCACTCTTCTCGCCGTTGACCTCGA
CAAGGACGGCCAGCTGGTGGGCACTCCCATGGAGAACAACGTCGAGATGA
GCTCGCACGATGTTGTTTTCTCGGCCAGCGATTCCGGCACTTATACTTTTGG
AGCTTCTCTCGTTCACGACGGCCAGACCGATAAGGTTTCCGCCGATCGCTCC
CGAACTTTACGCTGTCTCTTATGGCTCCGACTCTGTCCAGCGTAACCAGCGG
GGGG
```

Bakteriofág WhisL3 (vzorek C4 - pruh D):

```
GTTTGTGTATTTGCCCTATCTCGCTGGTTTCGCCTGCCTTCGGCATGGAGTT
GTTACGCCATAAGGCAATTAATCGTTTAATGAGTTGGAAACAAGTCTTTA
TTTTCGCTGTCCACATGTTTTCTTCATCAAGTTGGCTTTTGGTAAAAATGGGT
CTACACTTTGAGGTTCTGTCTTGTGATGCTTTCAACTGACACTTGTATACGA
CCTTTTCCTATCTCGTATATA
```

Bakteriofág WhisL4 (vzorek O):

ATTTCTTAAATTATAATCGTTTCTACTTTATCTAATGCCTTTATGACATGAGA
TGGTGCTACCATATACTTTGTTTAAGGAGTTTGAACCATACTTACTTTGCCTG
ACTTGAATCACTGTTTCTGGTTCACACTTGCAAGTGTACTATTGATGTTCTCT
ACACATTAACCGTGTCCACTGCTTATGTATTTCAATATTCTCTCCGGAATAT
AAAATCATGATGATGATTACTATT

Bakteriofág WhisM1 (vzorek H4):

GGGGTTGGGGGGCTTCGGGGGGATGCCGCGCGTTTGCTTCGTCGCGAGCTG
CTGTCTCGGCTGGGGCTGTCGTTCCAGCCCTTATGCCGGCCTGTCCTACCT
CAGCCTCTCTGGTTGTTTGGACCCCTGTTACAGACGGCCAAGATTCGAAGGG
GGTGAAGGCTTACTGGAAGGAAAGTGTGCTCTGCCCCCACCACAAACCAGG
CCCCGCCCCTGTGGAATTCATCTATAGTCCGTCAACCGGCCCCCTGGGATCC
CAGATCAATTCTCTGGCTCCAACCTCGCGAAGGTCTGCGACCCTGGCCATCTC
TGATGCCGAGCCGGGGATGTGCTGACTATGACTTTCAGGTGTGAGACATCCT
CTTTGCGGTGGGCGGCTATAGACTA

Bakteriofág WhisM2 (vzorek C4):

ATTTTAGGGAGCTCTCGCGTGTCTTATCGCGATACCTGCGCCCTAATCCTC
AAGGCCTAACGCTTTTAGCTCCTTTTATGGCAGCCAACCAGGGTTTCCATTC
CCGTTTTCTCCCTATGCTTTCCCCCTCAGATTTAAGTTATGCCAGAGACTGCA
CACAATTCTAATATTCAACAGATCTTAACATTTCAACGCTACACCTGCACTT
TACCTACCATCTCAAAATAGCAAACCACCCCTAATATCCCTCAAAATTCAC
TTGGTCTATTTAC

4.2 Tvorba fylogenetických stromů

Při vytváření fylogenetických stromů byla zjištěna příbuznost objevených bakteriofágů (primery Mzia) s mořskou skupinou bakteriofágů T4 (Příloha 4).

Dále byla zjištěna příbuznost objevených bakteriofágů (primery Lav) s rodinou bakteriofágů T7 (Příloha 5). Avšak při porovnávání sekvencí bakteriofága WhisL1 s bakteriofágem *Enterobacteria bakteriofág T7* byla nalezena shoda pouze v 0,5 % (Příloha 6, Obr. 1). Shoda byla pouze v ojedinelých sekvenčních motivech. Docházelo k porovnávání krátké sekvence bakteriofága WhisL1 s celým genomem *Enterobacteria bakteriofág T7*. Dále byla zjištěna příbuznost nově objevených bakteriofágů s primery Lav mezi sebou (Příloha 6, Obr. 2-5).

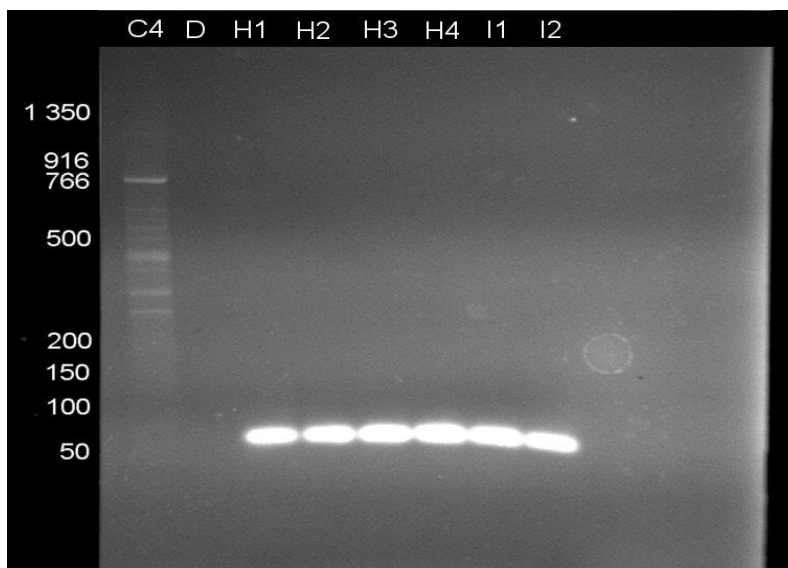
Tabulka 1 - Přehled veškerých vzorků, ve kterých byla amplifikována bakteriofágová DNA na gelu, nehledě na úspěšnost při sekvenování.

<i>Označení vzorku</i>	<i>Druh organismu</i>	<i>Lokalita</i>	<i>Datum sběru</i>	<i>Lav</i>	<i>Mzia</i>
A1	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	30. 4. 2016	-	-
A2	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	5. 5. 2016	-	-
B	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	25. 5. 2016	-	-
C1	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	7. 12. 2016	-	-
C2	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	7. 12. 2016	-	+
C3	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	7. 12. 2016	-	+
C4	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	7. 12. 2016	+	+
D	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	30. 6. 2016	-	+
E1	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	10. 7. 2016	-	-
E2	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	21. 7. 2016	-	-
F	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	18. 8. 2016	-	-
G	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	23. 7. 2016	-	-
H1	klíště (<i>Ixodes</i> sp.)	Čerňovice, okres Plzeň-sever	15. 8. 2016	-	+
H2	klíště (<i>Ixodes</i> sp.)	Čerňovice, okres Plzeň-sever	22. 8. 2016	-	+
H3	klíště (<i>Ixodes</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	30. 8. 2016	-	+
H4	klíště (<i>Ixodes</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	31. 8. 2016	-	+
CH	rejsek (<i>Sorex</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	31. 8. 2016	-	-
I1	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	31. 8. 2016	+	+
I2	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	2. 9. 2016	+	+
J	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	4. 9. 2016	-	-
K	klíště (<i>Ixodes</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	13. 10. 2016	-	-

L	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	21. 9. 2016	-	-
M	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Čerňovice, okres Plzeň-sever	1. 3. 2017	-	-
N	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	3. 3. 2017	+	-
O	kliště (<i>Ixodes</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	3. 3. 2017	+	-
P	myšice (<i>Apodemus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	8. 9. 2016	-	-

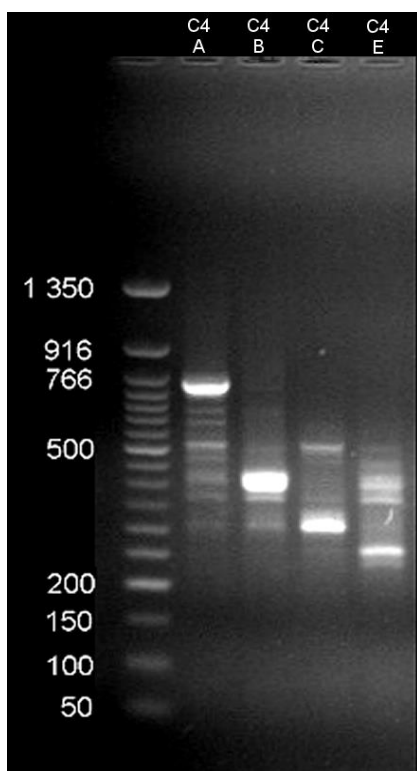
Tabulka 2 - Výsledky sekvence.

<i>Označení vzorku</i>	<i>Druh organismu</i>	<i>Lokalita</i>	<i>Datum sběru</i>	<i>Primery</i>	<i>Nově objevené bakteriofágy</i>
C4	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	28. 6. 2016	Lav	WhisL1
					WhisL2
					WhisL3
O	kliště (<i>Ixodes</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	3. 3. 2017	Lav	WhisL4
H4	kliště (<i>Ixodes</i> sp.)	Jankov, okres České Budějovice	31. 8. 2016	Mzia	WhisM1
C4	hraboš (<i>Microtus</i> sp.)	Losiná, okres Plzeň-město	28. 6. 2016	Mzia	WhisM2



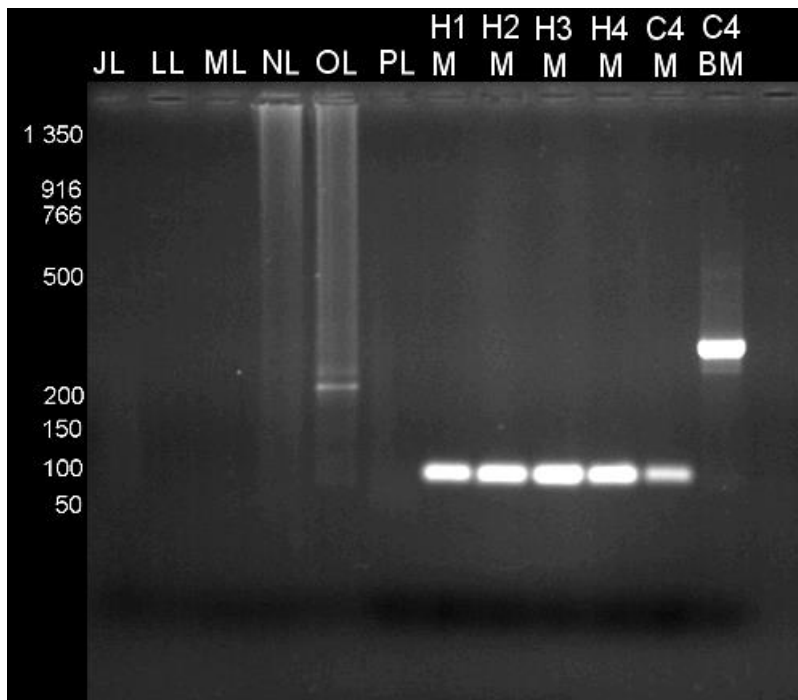
Obrázek 4 - Některé amplifikace vzorků na gelu.

Obr. 4: C4,D: hraboš (*Microtus* sp.) - primer Lav; H1- H4: klíště (*Ixodes* sp.) - primer Mzia (neřaděné); I1, I2: hraboš (*Microtus* sp.) - primer Mzia (neřaděné).



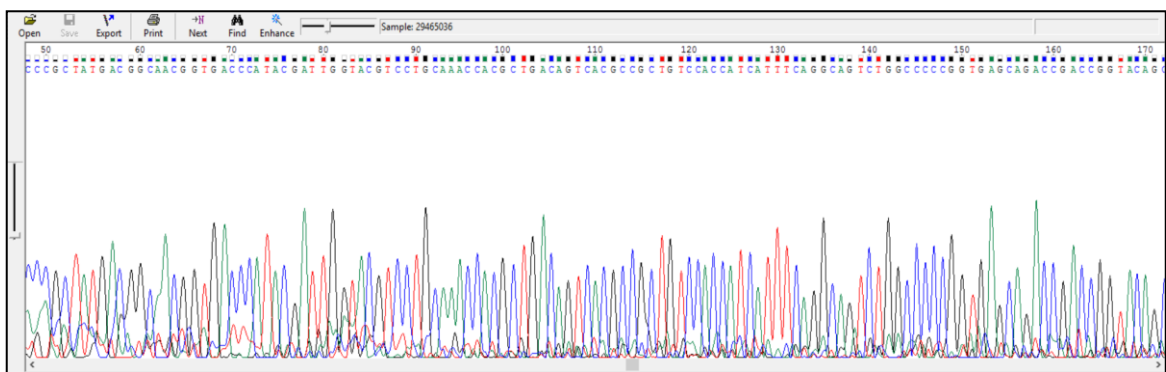
Obrázek 5 - Separace a další amplifikace vzorku C4 po vyřezání jednotlivých pruhů z gelu (viz Obr. 4).

Obr. 5: C4 pruhy A, B, C, E.



Obrázek 6 - Některé amplifikace vzorků na gelu.

Obř. 6: JL: hraboř (*Microtus* sp.) - primer Lav; LL-ML: myřice (*Apodemus* sp.) - primer Lav; OL: klířtě (*Ixodes* sp.) - primer Lav; PL: myřice (*Apodemus* sp.) - primer Lav; H1M- H4M: klířtě (*Ixodes* sp.) - primer Mzia (ředěné dvacetkrát); C4M: hraboř (*Microtus* sp.) - primer Mzia (ředěné dvacetkrát); C4BM - hraboř (*Microtus* sp.) - primer Lav (opakována PCR po vyřezání z gelu).



Obrázek 7 - Graf sekvence (sekvenogram) bakteriofága WhisL1.

5 Diskuze

Pilotní práce ohledně screenování bakteriofágů u hlodavců a klíšťat prokázala použitelnost metody izolace a amplifikace bakteriofágové DNA pomocí degenerovaných primerů. Jednalo se o dvě dvojice různých primerů, první původně určená na screening mořských bakteriofágů z rodiny T4 a druhá vytvořená pro testování bakteriofágů z rodiny T7.

Práci jsem rozšířila rovněž o screening bakteriofágů z klíštěte (*Ixodes* sp.). Je možno předpokládat, že bakteriofágy vyskytující se u klíšťat jsou spíše využitelné k terapii, jelikož je v organismu klíštěte zřejmě méně bakteriofágů než v organismu hlodavců. U hlodavců je možno očekávat větší výskyt bakterií zejména v zažívacím traktu, tudíž i větší procento výskytu bakteriofágů, kteří na těchto bakteriích parazitují. Nalezené bakteriofágy u klíšťat mohou být s určitou pravděpodobností parazité na bakteriích (*Borrelia*, *Anaplasma*; viz kap. „Charakteristika živočichů - potenciálních hostitelů bakterií“) (Volf a Horák 2007, Ismail a kol. 2010), které jsou nebezpečné pro některé savce, včetně člověka. Jak jsem již v této práci uvedla (viz kap. „Charakteristika živočichů - potenciálních hostitelů bakterií“), klíšťata jsou přenašeči různých nemocí (Papáček a kol. 2000, Volf a Horák 2007). Nalezené bakteriofágy v jejich organismech by tudíž mohly být využity k léčbě těchto nemocí.

5.1 Bakteriofágy a neurodegenerativní choroby

Cílem této práce bylo mimo jiné i nalézt takové fágy, které by se mohly využít pro léčbu bakteriálních či neurodegenerativních chorob vyvolaných infekčními bakteriemi. Otázkou zůstává, zda jsou neurodegenerativní choroby opravdu způsobené bakteriemi. Vědeckých prací, které tuto myšlenku podporují, není zatím příliš mnoho a jejich citovanost není velká. Přesto již existuje návrh, že lze Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu léčit pomocí bakteriofágů (Messing 2016). V této práci ale není zřejmé, jak a kde potřebné bakteriofágy získávat.

5.2 Problematika při získávání čisté bakteriofágové DNA

Největším problémem při identifikaci fágové DNA bylo její čištění. Pokusila jsem se o tradiční čištění pomocí akrylamidového gelu, jež bylo překvapivě neúspěšné. Proto jsem se rozhodla použít gel agarozový. Veškerou DNA jsem těsně před nanesením na gel zahřála na 95 °C. Zabránila jsem tak promísení a částečné hybridizaci

homologických i částečně homologických fragmentů DNA. Tím došlo i k denaturaci všech DNA řetězců ve vzorku. Po vyřezání z gelu se ukázalo, že většina produktů byla natolik čistá, že je bylo možné po extrakci z gelu sekvenovat.

U dvojice primerů Mzia (identifikace fágů z rodiny T4 z mořské vody) se dále prokázalo, že pouhé čištění na agarozovém gelu, popsané výše, bylo nedostatečné. Dodatečně se tedy jeví jako vhodná myšlenka ředit trus hlodavců natolik, aby mohly být amplifikovány jednotlivé bakteriofágové řetězce DNA, nikoliv celé skupiny bakteriofágů současně. Nutnost ředění substrátu z literatury (viz Filée a kol. 2005) nebyla zřejmá, ale koncentrace bakteriofágů v mořské vodě je zřejmě nižší než v trusu hlodavců. Na základě této problematiky jsem prováděla ředící řady, a to celkem 20krát již z genomové DNA. U pozitivních vzorků, kde se zdařila amplifikace bakteriofágové DNA, bylo bohužel již na začátku málo substrátu, nemohla jsem jej tedy dodatečně zředit a provést další identifikaci.

5.3 Porovnání klíšťat a hlodavců

Cílem této práce nebylo zmapovat výskyt bakteriofágů u hlodavců či u klíšťat na různých lokalitách. Zaměřila jsem se na ověření a fungování metodiky na úplně jiných objektech, než na které jsou primery určeny. Rovněž bylo cílem nalézt nové druhy bakteriofágů, v čemž byla tato práce úspěšná.

Ohledně celkového porovnání nově nalezených bakteriofágů jsem byla nejúspěšnější u hrabošů (*Microtus* sp.). Nalezla jsem celkem tři nové bakteriofágy s primery Lav a jednoho bakteriofága s primery Mzia. Dále jsem našla dva nové bakteriofágy u klíšťat (*Ixodes* sp.) a to s oběma dvojicemi primerů. Nepodařilo se mi osekvenovat bakteriofágovou DNA z organismu myšice (*Apodemus* sp.), přestože jsem fágovou DNA amplifikovala. Zřejmě se jí nepodařilo dostatečně vyčistit od příměsí dalších druhů bakteriofágů. Amplifikované sekvence, které se nepodařilo sekvenovat Sangerovou metodou, by zřejmě bylo možno sekvenovat pomocí některé z nových metod sekvenování, např. Illumina (Caporaso a kol. 2012). Touto sekvenační metodou bych přesáhla finanční možnosti mé práce.

Je zde určitá pravděpodobnost, že bakteriofágy, které jsem izolovala z klíšťat, byly hostiteli právě bakterií rodu *Borrelia*. Klíšťata přenášejí z bakteriálních onemocnění nejčastěji lymeskou boreliózu (Volf a Horák 2007), která je způsobena právě rodem *Borrelia*. Nelze vyloučit, že by tyto bakteriofágy mohly být případně

použity pro léčbu lymeské boreliózy. Bakteriofágy, které jsem našla, však nemusí být hostiteli pouze v *Borreliích*, ale samozřejmě i v jiných rodech bakterií, například rodu *Anaplasma* a dalších. Bakteriofágy anaplasmat nejsou dostatečně prozkoumány. Screening bakteriofágů vyskytujících se potenciálně u bakterií rodu *Anaplasma* je do budoucna velmi důležitý, jelikož klíšťata mohou být rovněž jejich přenašeči (Ismail a kol. 2010). Není tedy ani vyloučeno, že jsem v práci identifikovala bakteriofágy parazitující právě u těchto bakterií. Samozřejmě je také možnost, že byly identifikovány bakteriofágy některých neškodných bakterií, tvořící přirozenou součást organismů klíšťat. Bylo by nutné vyzkoušet izolované nativní bakteriofágy přímo na čistých kulturách jednotlivých druhů bakterií např. *Borrelia burgdorferi*. Zde je široké pole pro další výzkum.

Podobně u hrabošů se v trávicím traktu vyskytuje nespočet různých bakterií. Nemohu tedy s přesností vyčlenit bakteriální rody, na kterých bakteriofágy, objevené v této práci, parazitovaly.

Je známo, že bakteriofágy se mohou v hostitelské buňce rovněž vyskytovat ve formě profága (Alberts 1998). Otázkou zůstává, zda bakteriofágy, které jsem izolovala, byly obsaženy v buňkách bakterií jakožto lyzující patogeny, či právě ve formě profága. Použitou metodou zatím nelze zjistit, v jakém stadiu jsem bakteriofágy objevila. Bylo by nutné sekvenovat jednotlivé bakteriální genomy původních hostitelů.

Hlavní přínos práce vidím v ověření funkčnosti zejména primerů Lav, které nebyly doposud použity v praxi. Do budoucna by mohly být dvojice primerů Mzia i Lav použity pro metagenomické bakteriofágové studie, podobně jako např. Edwards a kol. (2015). Primery vytvořené aplikací PhiSiGns se uplatnily i v dalších identifikacích bakteriofágů (Hopkins a kol. 2014). Pro budoucí metagenomické bakteriofágové studie na klíšťatech a hlodavcích považuji za potřebné vytvořit více podobných primerů pro další skupiny bakteriofágů, nejen pro rodiny T4 a T7.

5.4 Charakteristika fylogenetických stromů

5.4.1 Primery Mzia

Jednotnou molekulární taxonomii je nemožné vytvořit, jelikož viry nemají společně sdílené sekvence. V důsledku toho na bakteriofázích sledujeme jejich ekologii a celkovou různorodost, včetně odlišných molekulárních úseků jejich DNA, specifických pro dané typy fágů. Analýza pomocí těchto specifických sekvencí je

zaměřená v této práci především na rodinu fágů T4, která nám dává poměrně přesnou fylogenezi pro celý získaný genom. Ukázalo se, že fylogeneze T4 fága na základě konzervativních zbytků v centrální části hlavního kapsidového proteinu g23 byla shodná s fylogenezí, která byla založena na základě některých dalších fágových funkcí. K dispozici je celkem 16 kompletně sekvenovaných genomů T4 bakteriofága. U všech T4 fágů je hlavní kapsidový protein kódován homologním genem T4 G23. Na základě toho Filée a kol. (2005) navrhli primery, které jsem ve své práci použila. Je důležité rovněž poznamenat, že ne u všech rodin bakteriofágů existují tak jednoznačné a jednoduché fylogenetické sekvence. Některé skupiny fágů mají značně větší modulární genetickou výměnu v jejich genech než skupina T4. U některých virů dokonce ani nebyly dosud identifikovány specifické genetické znaky či sekvence (Filée a kol. 2005).

V Příloze 4 uvádím fylogenetické stromy, kde jsou uvedeny veškeré bakteriofágy objevené Filéem a kol. (2005). Do těchto stromů jsou zároveň umístěné i dva nové bakteriofágy objevené v této práci. První strom je vytvořen metodou maximální věrohodnosti (viz Tamura a Nei 1993, Kumar a kol. 2016). Druhý strom jsem vytvořila metodou Neighbor-joining (viz Saitou a Nei 1987, Tamura a kol. 2004, Kumar a kol. 2016). V obou případech je zde jednoznačná příbuznost, ale je rovněž jasné, že se jedná o novou skupinu bakteriofágů. U každé metody se prokázala příbuznost s mořskými bakteriofágy z rodiny T4 fágů. Pokaždé však vyšlo postavení nově objevených bakteriofágů ve fylogenetickém stromě poněkud odlišně. V této práci jsem dokázala, že primery Mzia jsou použitelné pro T4 fágy, které se vyskytují nejen v mořské vodě, ale i u hlodavců a klíšťat.

Příbuznost fágových genomů mezi mořskými a středoevropskými bakteriofágy je pravděpodobně způsobená různými výměnami biologického materiálu z pevninského prostředí na prostředí mořské či oceánské. Difuze je možná například díky řekám, ať už přímo přes organismy nebo lze uvažovat, že bakteriofágy se přenáší separátně v říční vodě. Obráceně je asi přenos méně výrazný a pravděpodobný, ale dochází k němu zřejmě také. Příkladem migrujících živočichů, potenciálních přenašečů bakteriofágů, mohou být ryby migrující z mořského prostředí do řek. Další pravděpodobný přenos může být uskutečněný pomocí prachu, jelikož viry jsou malé organismy a mohou být tudíž součástí prachových částic.

5.4.2 Primery Lav

Pro screenování bakteriofágů jsem využila i další možnost, a to pomocí primerů Lav. Z mé práce vyplývá, že metoda vytvoření primerů na detekci fágů pomocí databáze a aplikace PhiSiGns (Dwivedi a kol. 2012) je použitelná v praxi. Avšak bohužel v databázi chybí vygenerování primerů pro fágy napadající rod *Borrelia* (Dwivedi a kol. 2012), [8]. Nicméně jsem pomocí těchto degenerovaných primerů detekovala bakteriofágy u klíšťat. Je tedy určitá pravděpodobnost, že tyto bakteriofágy mohly parazitovat na bakteriích rodu *Borrelia*. Dále jsem pomocí těchto primerů našla bakteriofágy i v trusu hlodavců, kde je však širší spektrum bakteriálních kmenů, které mohly bakteriofágy napadat.

V Příloze 5 uvádím fylogenetické stromy pro bakteriofágy izolované s primery Lav. Pro tvorbu fylogenetických stromů jsem vybrala genomy na základě práce Dwivedi a kol. (2012) z rodiny T7 bakteriofágů. Právě na základě těchto sekvencí byly vytvořeny primery Lav (Dwivedi a kol. 2012). Sekvence těchto genomů jsem převzala z NCBI. Stromy byly stejně jako s primery Mzia vytvořeny dvěma různými metodami. Metodou maximální věrohodnosti (viz Tamura a Nei 1993, Kumar a kol. 2016) a metodou Neighbor-joining (viz Saitou a Nei 1987, Tamura a kol. 2004, Kumar a kol. 2016). Prokázala se příbuznost nově objevených bakteriofágů s bakteriofágy rodiny T7.

Zatímco u primerů Mzia byly porovnávány sekvence stejné délky, namnožené stejnými primery - porovnávala jsem nově objevené bakteriofágy s bakteriofágy objevenými v práci Filée a kol. 2005. U primerů Lav tomu tak nebylo. Byly srovnávány krátké úseky sekvencí nově objevených bakteriofágů s celými genomy bakteriofágů rodiny T7. Došlo tedy k nepoměru při fylogenetické analýze. Považuji fylogenetické stromy pro primery Lav za mnohem méně věrohodné než pro primery Mzia. Při alignmentu bakteriofága *Enterobacteria bakteriofág T7* s bakteriofágem WhisL1 byla shoda naprosto minimální (0,5 %) (Příloha 6, Obr. 1), a to pouze v roztroušených sekvenčních motivech, nicméně analýza programem MEGA7 určitou příbuznost zobrazuje. S velkou pravděpodobností existuje příbuznost mezi všemi nově izolovanými bakteriofágy, amplifikovanými primery Lav. V Příloze 6 uvádím vybrané příklady alignmentů těchto fágů. Sekvence bakteriálních virů WhisL3 a WhisL4 se shodují v 51 % (Příloha 6, Obr. 5). Podobnost těchto dvou sekvencí nově objevených bakteriofágů je dle mého názoru relativně vysoká. Další příklady srovnávání nově objevených bakteriofágů v Příloze 6 se pohybují v rozmezí 36-45 %.

6 Závěr

Klíčovým výsledkem v této práci je prokázání fungování nové aplikace metodiky amplifikace bakteriofágové DNA. Celkem se mi podařilo izolovat patnáct druhů bakteriofágové DNA, načež jsem šest bakteriofágů identifikovala a získala jejich sekvence. Novým poznatkem je zjištění příbuznosti a postavení těchto objevených bakteriofágů ve fylogenetických stromech. Prokázala se příbuznost mořských bakteriofágů a fágů, parazitujících na bakteriích, z organismů hlodavců či klíšťat. Příbuznost nově objevených bakteriofágů s rodinou bakteriofágů T7 je diskutabilní, přestože byly tyto nově objevené bakteriofágy izolované primery právě pro rodinu T7 bakteriofágů. Dvojice použitých primerů mohou být do budoucna vhodné pro metagenomické studie na bakteriofázích.

7 Literatura

Ackermann, H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 154(4):245-51.

Alberts, B. 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložil Kotyk, A., Bohumil Bouzek, B., Hozák, P. Espero, 288-291. Ústí nad Labem.

Anděra, M. a Horáček, I. 2005. *Poznáváme naše savce*. Sobotáles, 327s. Praha.

Babb, K., Bykowski, T., Riley, S.P., Miller, M.C., Demoll, E. a Stevenson, B. 2006. *Borrelia burgdorferi* EbfC, a novel, chromosomally encoded protein, binds specific DNA sequences adjacent to erp loci on the spirochete's resident cp32 prophages. *J Bacteriol* 188: 4331-9.

Betts, A., Vasse, M., Kaltz, O. a Hochberg, M.E. 2013. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Evol* 1054-63.

Burri, C., Schumann, O., Schumann, C., a Gern, L. 2014. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks and tick-borne diseases* 5(3), 245-251.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. a Knight, R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6(8):1621-4.

Dezfulian, M., Shokrgozar, M.A., Sardari, S., Parivar, K. a Javadi, G. 2008. Can phages cause Alzheimer's disease? *Medical Hypotheses* 71, 651-656.

Dwivedi, B., Schmieder, R., Goldsmith, D.B., Edwards, R.A. a Breitbart, M. 2012. PhiSiGns:an online tool to identify signature genes in phages and design PCR primers for examining phage diversity. *BMC Bioinformatics* 13:37.

Edwards, R.A., McNair, K., Faust, K., Raes, J. a Dutilh, B.E. 2015. Computational approaches to predict bacteriophage-host relationships. *FEMS Microbiol Rev* 40(2):258-72.

Eggers, Ch.H., Kimmel, B.J., Bono, J.L., Elias, A.F., Rosa, P. a Samuels, D.S. 2001. Transduction by phiBB-1, a bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 183: 4771-8.

Eggers, Ch.H. a Samuels, D. S. 1999. Molecular Evidence for a New Bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 181(23): 7308–7313.

Eshelman, C.M., Vouk, R., Stewart, J.L., Halsne, E., Lindsey, H.A., Schneider, S., Gualu, M., Dean, A.M. a Kerr, B. 2010. Unrestricted migration favours virulent pathogens in experimental metapopulations: evolutionary genetics of a rapacious life history. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365, 2503–2513.

Filée, J., Tétart, F., Suttle, C.A. a Krisch, H.M. 2005. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35):12471-6.

Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology* 10, 226.

Gaisler, J. a Zima, J. 2007. *Zoologie obratlovců*. Academia, 585-603. Praha.

Green, M.R. a Sambrook, J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1885s. New York, USA.

Guilfoile, P. 2004. *Ticks off!: controlling ticks that transmit lyme disease on your property*. ForSte Press, 80s. Florida, USA.

Halperin, J.J. 2011. Nervous system lyme disease: is there a controversy? *Semin Neurol J*. 31(3):317-24.

Hankin, E.H. 1896. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. Inst. Pasteur* 10, 511.

Hayes, S.F., Burgdorfer, W. a Barbour, A.G. 1983. Bacteriophage in the Ixodes dammini spirochete, etiological agent of Lyme disease. *J Bacteriol*. 154:1436-9.

d'Herelle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris* 165, 373–375.

Hopkins, M., Kailasan, S., Cohen, A., Roux, S., Tucker, K.P., Shevenell, A., Agbandje-McKenna, M. a Breitbart, M. 2014. Diversity of environmental single-stranded DNA phages revealed by PCR amplification of the partial major capsid protein. *ISME J* 8(10):2093-103.

Chaudhry, W.N., Haq, I.U., Andleeb, S. a Qadri, I. 2014. Characterization of a virulent bacteriophage LK1 specific for *Citrobacter freundii* isolated from sewage water. *J Basic Microbiol* 54(6):531-41.

Ismail, N., Bloch, K.C. a McBride, J.W. 2010. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *CLINICS IN LABORATORY MEDICINE* 0272-2712.

Jang, J., Kocian, V. a Pravda, O. 1965. *Zoologie*. Státní pedagogické nakladatelství, 248-255. Praha.

Jiang, H., Wang, S., Li, C., Liu, D., Yu, C., An, X., Mi, Z., Chen, J. a Tong, Y. 2011. Rapid genetic characterization of a novel Enterobacteria phage and determination of its host recognizing genes. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 27:884-90.

- Khanakah, G., Kocianova, E., Vyrostekova, V., Rehacek, J., Kundi, M. a Stanek, G. 2006. Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi sensu lato* in rodents from north eastern Austria. *Wien Klin Wochensh* 118: 754-8.
- Kudva, I.T., Jelacic, S., Tarr, P.I., Youderian, P. a Hovde, C.J. 1999. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 65(9):3767-73.
- Kumar, S., Stecher, G. a Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Lavigne, R., Seto, D., Mahadevan, P., Ackermann, H.W. a Kropinski, A.M. 2008. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol* 159(5):406-14.
- Margos G., Vollmer, S.A., Nicholas, H., Ogden, N.H. a Fish, D. 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infection, Genetics and Evolution* 11 1545–1563.
- Messing, J. 2016. Phage M13 for the treatment of Alzheimer and Parkinson disease. *Gene* 583 (2), 85-9.
- Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B. a Górski, A. 2007. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 3;61:461-5.
- Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B. a Górski, A. 2009. A retrospective analysis of changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses. *Clin Exp Med* 9: 303-12.
- Miklosy, J. 2011. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med.* 13:e30.

- Miklossy, J. 2012. Chronic or late lyme neuroborreliosis: analysis of evidence compared to chronic or late neurosyphilis. *Open Neurol J.* 6:146-57.
- Mitchell, H.L., Dashper, S.G., Catmull, D.V., Paolini, R.A., Cleal, S.M., Slakeski, N., Tan K.H., a Reynolds, E.C. 2010. *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiology* 156: 774-88.
- 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: 745-765.
- Palumbi, S., Martin, A., McMillan, O. W., Stice, L. a Grabowski, G. 2002. *THE SIMPLE FOOL'S GUIDE TO PCR*. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, 45s. Hawaii, USA.
- Papáček, M., Matěnová, V., Matěna, J. a Soldán, T. 2000. *Zoologie*. Scienta, spol. s. r. o., pedagogické nakladatelství, 73-74. Praha.
- Radzijeuskaja, J., Paulauskas, A., Rosef, O., Petkevičius, S., Mažeika, V. a Rekašius, T. 2013. The propensity of voles and mice to transmit *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection to feeding fickle. *Vet Parasitol* 18;197(1-2):318-25.
- Rosypal, S. 2000. Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. Molekulární biologie virů, mutagenese, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA. Brno: Stanislav Rosypal, 609-638. Brno.
- Saitou, N. a Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sanger, F. a Coulson, A.R. 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett* 87(1):107-10.

Shen, G.H., Wang, J.L., Wen, F.S., Chang, K.M., Kuo, C.F., Lin, C.H., Luo, H.R. a Hung, C.H. 2012. Isolation and characterization of ϕ km18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 7:e46537.

Śliwa-Dominiak, J., Suszyńska, E., Pawlikowska, M. a Deptuła, W. 2013. Chlamydia bacteriophages. *Arch Microbiol* 195(10-11):765-71.

Smith, L.M., Sanders, J.Z. a Kaiser, R.J. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (6071): 674–9.

Sohrab, S.S., Karim, S., Kamal, M.A., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G., Al-Qahtani, M.H. a Mirza, Z. 2014. Bacteriophage - A Common Divergent Therapeutic Approach for Alzheimer's Disease and Type II Diabetes Mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Target* 13(3):491-500.

Sulakvelidze, A. a Alavidze, Z. 2001. Minireview: Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 649–659.

Tamura, K. a Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

Tamura, K., Nei, M. a Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

Tiwari, R., Dhama, K., Kumar, A., Rahal, A. a Kapoor, S. 2014. Bacteriophage therapy for safeguarding animal and human health: a review. *Pak J Biol Sci.* 17(3):301-15.

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. *J Antimicrob Chemother* May 28. pii: dku173.

Vostal, K. a Zakovska, A. 2003. Two-year study of examination of blood from wild rodents for the presence of antiborrelial antibodies. *Ann Agric Environ Med* 10:203-6.

Volf, P. a Horák, P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton, 262-265. Praha.

Wang, X., Lim, H.J. a Son, A. 2014. Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *Environ Health Toxicol* 29:e2014007.

Závodská, R. 2006. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. Scientia, 128-131. Praha.

7.1 Internetové zdroje

- [1] Klíšťata a jimi přenášená onemocnění v Jihočeském kraji a regionech Bavorska. *Klíšťata a jimi přenášená onemocnění v Jihočeském kraji a regionech Bavorska* [online]. 2008 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: http://gisak.vsb.cz/klistata/index_cz.html
- [2] Klíště.cz. *Klíště.cz* [online]. 2008 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://www.kliste.cz/>
- [3] BioLib. *BioLib* [online]. 2017 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/>
- [4] BioGen. *BioGen* [online]. [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://www.biogen.cz/>
- [5] NCBI. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [6] MEGA. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* [online]. [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://www.megasoftware.net/>
- [7] Cell Biology Unit Web Server. *ALIGN Query using sequence data* [online]. [cit. 2017-04-01]. Dostupné z: <http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>
- [8] PhiSiGns. *A Tool To Identify Signature Genes In Phages And Design PCR Primers* [online]. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://edwards.sdsu.edu/cgi-bin/phisigns/phisigns.cgi>

8 Resumé

This bachelor thesis examines bacteriophage screening, a modified methodology for the amplification of bacteriophage DNA. It is known that rodents or ticks could be natural carriers of the bacteria of genus *Borrelia*. It is likely presence bacteriophages in their organisms. This bacteriophages can be used to treat some neurodegenerative diseases such as lyme boreliosis. Six new bacteriophages from rodents and ticks was found. It is demonstrated related between marine bacteriophages and new bacteriophages from the organisms of rodents or ticks. The relationship of some new bacteriophages, to the T7 family of bacteriophages, remains indeterminate. These primers could be used to make appropriate professional metagenomic study on bacteriophages.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1- Základní schéma bakteriofága T4.....	2
Obrázek 2 - Lytický cyklus bakteriofága T4 (popis obrázku)	5
Obrázek 3 - Schematická ukázka nukleových kyselin majoritních skupin bakteriofágů .	7
Obrázek 4 - Některé amplifikace vzorků na gelu	28
Obrázek 5 - Separace a další amplifikace vzorku C4 po vyřezání jednotlivých pruhů z gelu (viz Obr. 4).....	28
Obrázek 6 - Některé amplifikace vzorků na gelu	29
Obrázek 7 - Graf sekvence (sekvenogram) bakteriofága WhisL1	29

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Přehled veškerých vzorků, ve kterých byla amplifikována bakteriofágová DNA na gelu, nehledě na úspěšnost při sekvenování	26
Tabulka 2 - Výsledky sekvenace	27

11 Přílohy

Příloha 1: Zákon 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání

Příloha 2: Fotografie některých vybraných úlovků kočky domácí

Příloha 3: Mapy lokalit, na kterých byl prováděn sběr živočichů

Příloha 4: Fylogenetické stromy - primery Mzia

Příloha 5: Fylogenetické stromy - primery Lav

Příloha 6: Srovnání (alignments) sekvencí

Příloha 1: Zákon 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání

V zákoně 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání podle § 15 odstavce 1 písmeno f) se mohou pokusy na zvířatech provádět za účelem výuky. Podle sbírky zákonů 409/2008 § 15 odstavce 1 písmene e) a g) mohou být pokusy povoleny, jsou-li nezbytné z důvodu výuky a výzkumu. V zákoně 246/92 Sb. na ochranu zvířat proti týrání podle § 15 odstavce 3 písmene e) se zákon nevztahuje na úkony, jejichž hlavním účelem je identifikace zvířete.

Příloha 2: Fotografie některých vybraných úlovků kočky domácí



Obr. 1: Myšice (*Apodemus* sp.), úlovek kočky domácí, 10. 7. 2016, Losiná okres Plzeň-město, vzorek E1.

Zdroj: vlastní fotografie, 10. 7. 2016



Obr. 2: Hraboš (*Microtus* sp.), úlovek kočky domácí, 2. 9. 2016, Losiná okres Plzeň-město, vzorek I2.

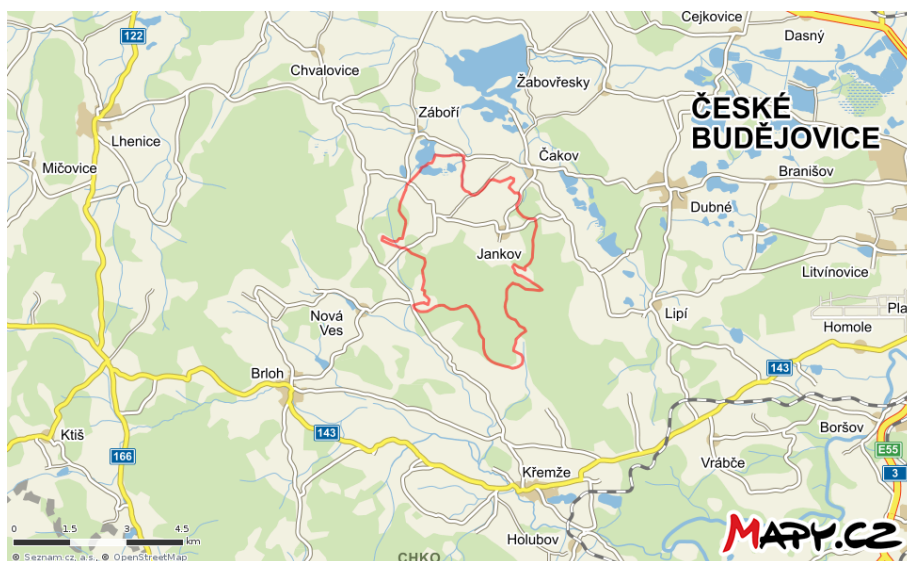
Zdroj: vlastní fotografie, 2. 9. 2016

Příloha 3: Mapy lokalit, na kterých byl prováděn sběr živočichů



Obr. 1: Lokalita Čerňovice, okres Plzeň-sever.

Zdroj: www.mapy.cz [9]



Obr. 2: Lokalita Jankov, okres České Budějovice.

Zdroj: www.mapy.cz [9]

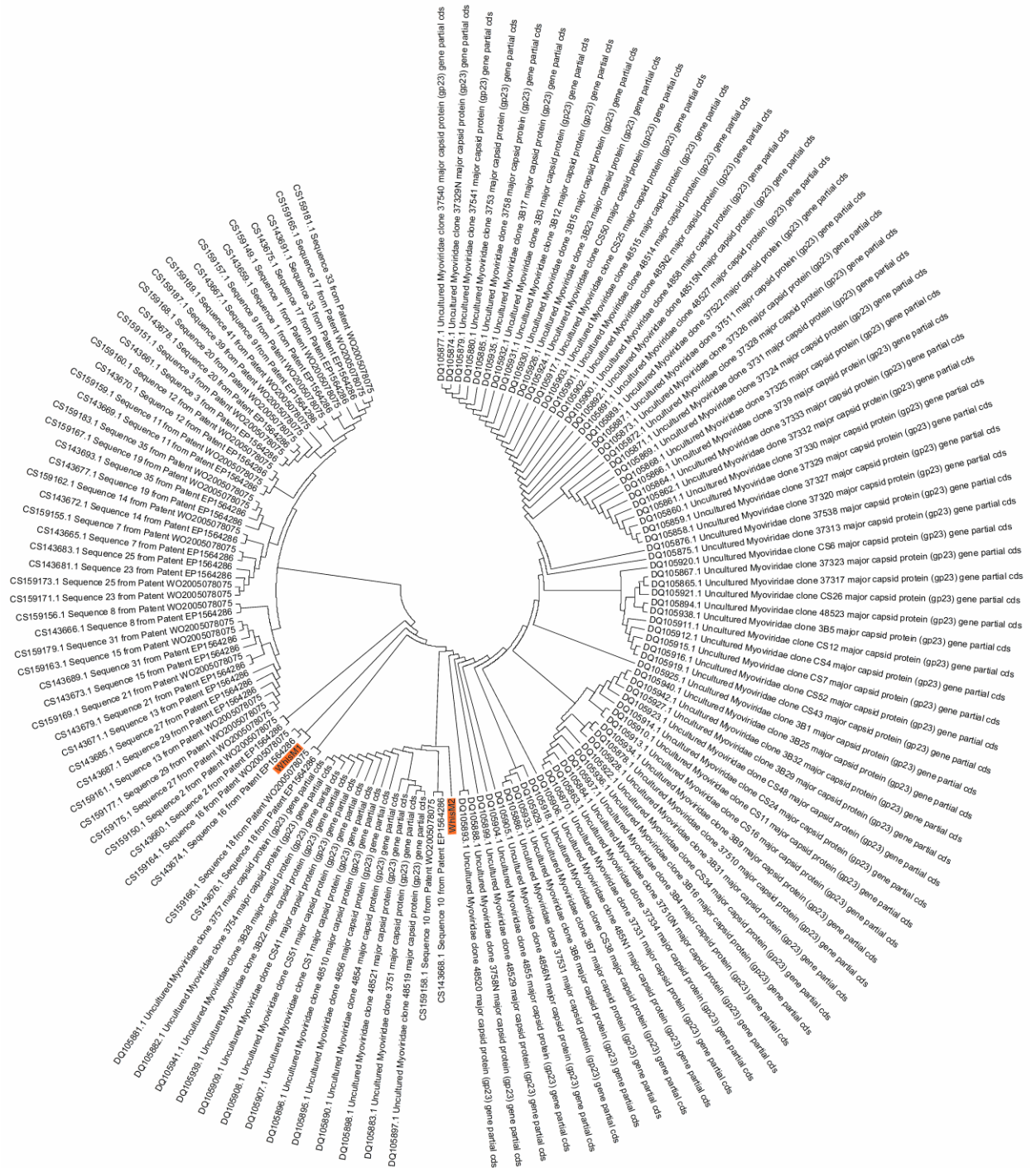


Obr. 3: Lokalita Losiná, okres Plzeň-město.

Zdroj: www.mapy.cz [9]

[9] Mapy.cz. *Mapy.cz* [online]. 2017 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=13.3667000&y=49.7500000&z=11>

Příloha 4: Fylogenetické stromy - primery Mzia

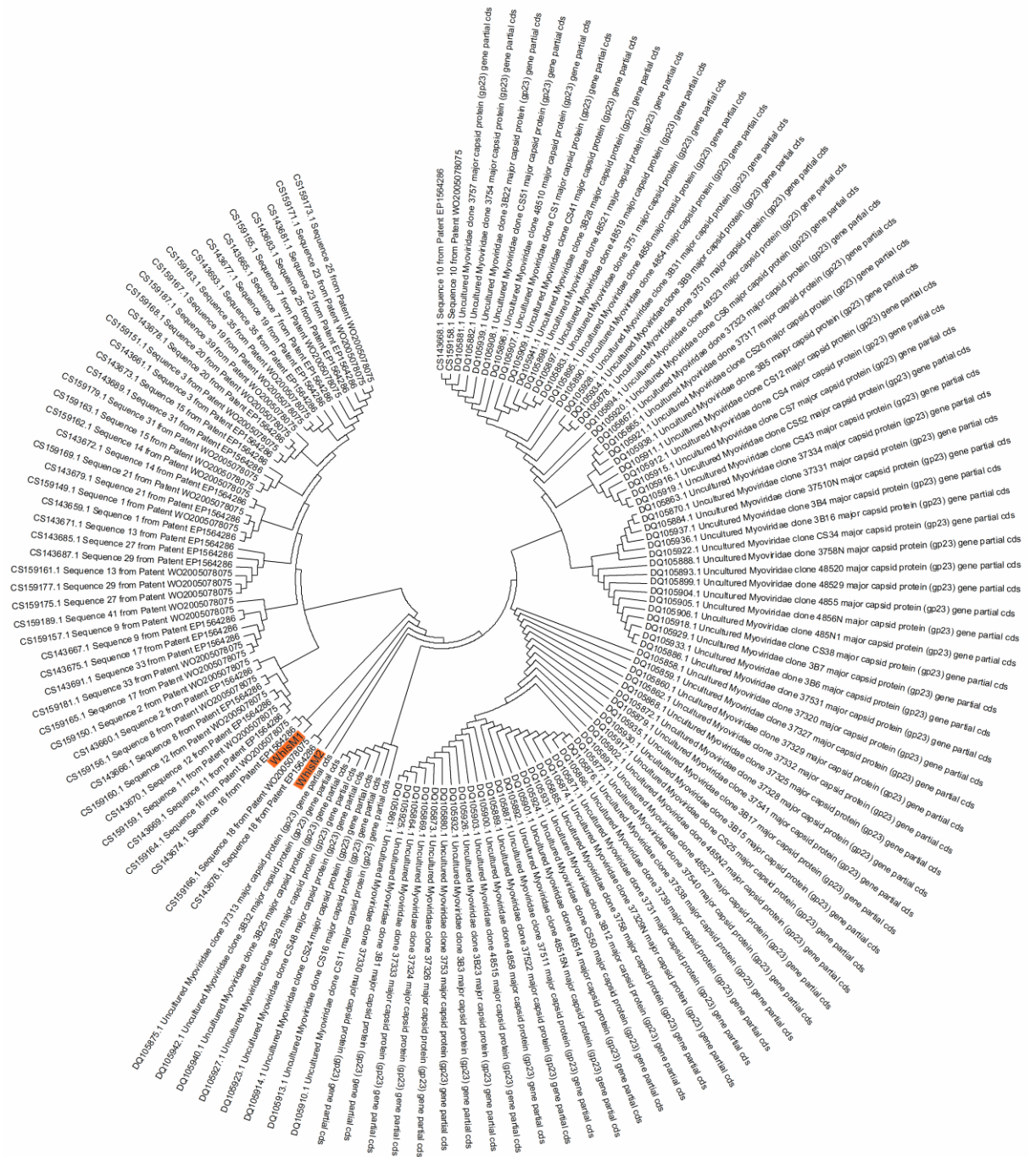


Obr. 1: Fylogenetický strom - primery Mzia.

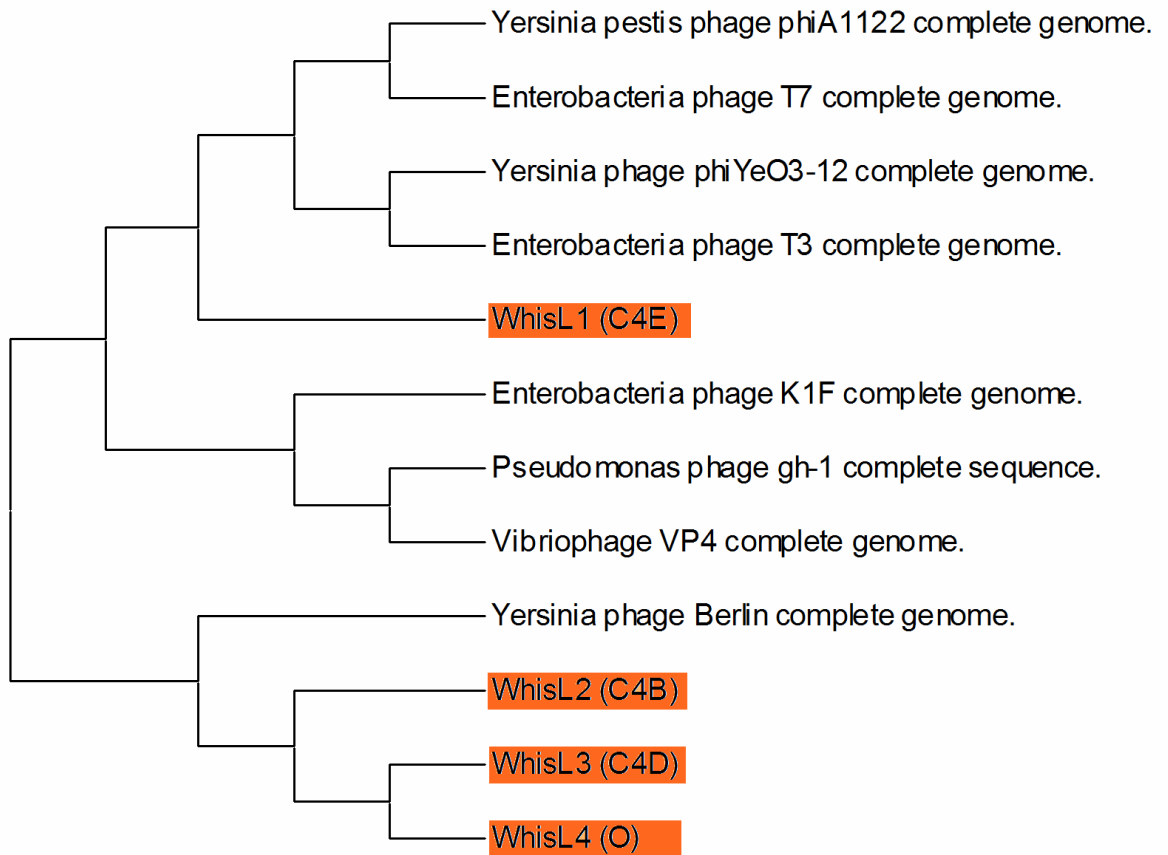
Vytvořeno v programu MEGA7, metoda maximální věrohodnosti. Použité sekvence viz Filée a kol. (2005) a dále nově objevené bakteriofágy.

Obr. 2: Fylogenetický strom - primery Mzia.

Vytvořeno v programu MEGA7, metoda Neighbor-joining. Použité sekvence viz Filée a kol. (2005) a dále nově objevené bakteriofágy.

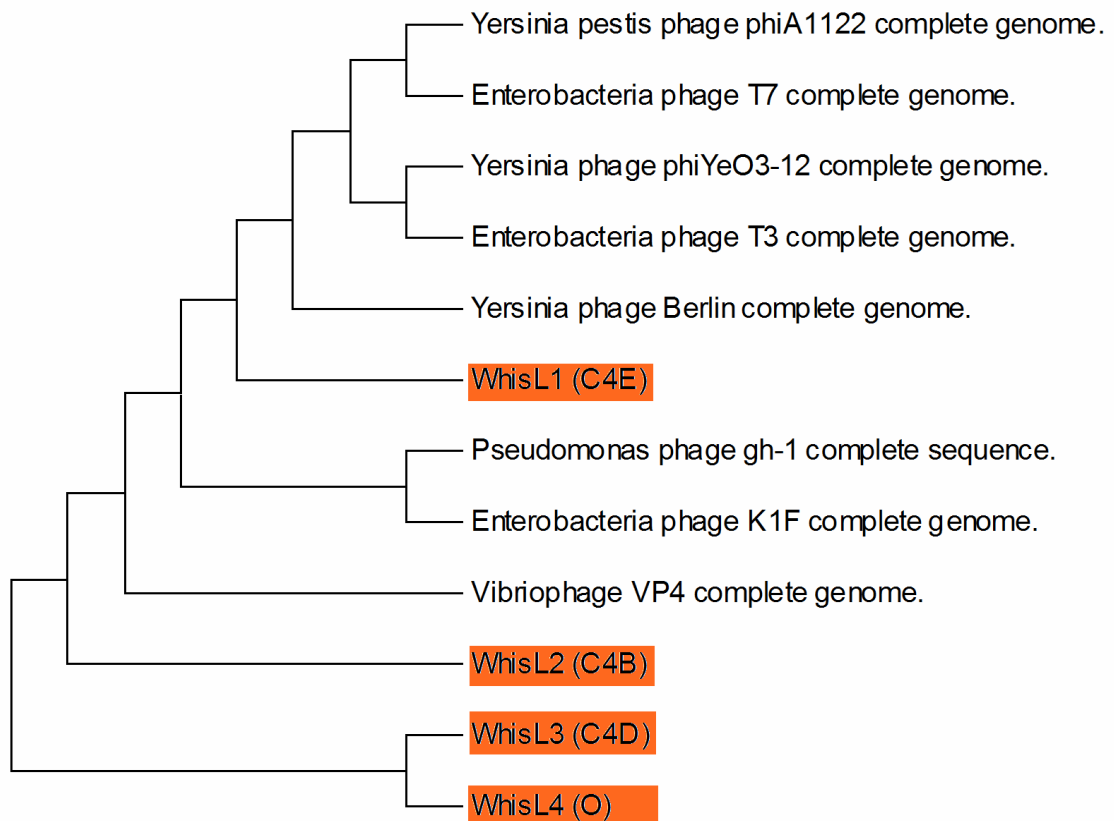


Příloha 5: Fylogenetické stromy - primery Lav



Obr. 1: Fylogenetický strom - primery Lav.

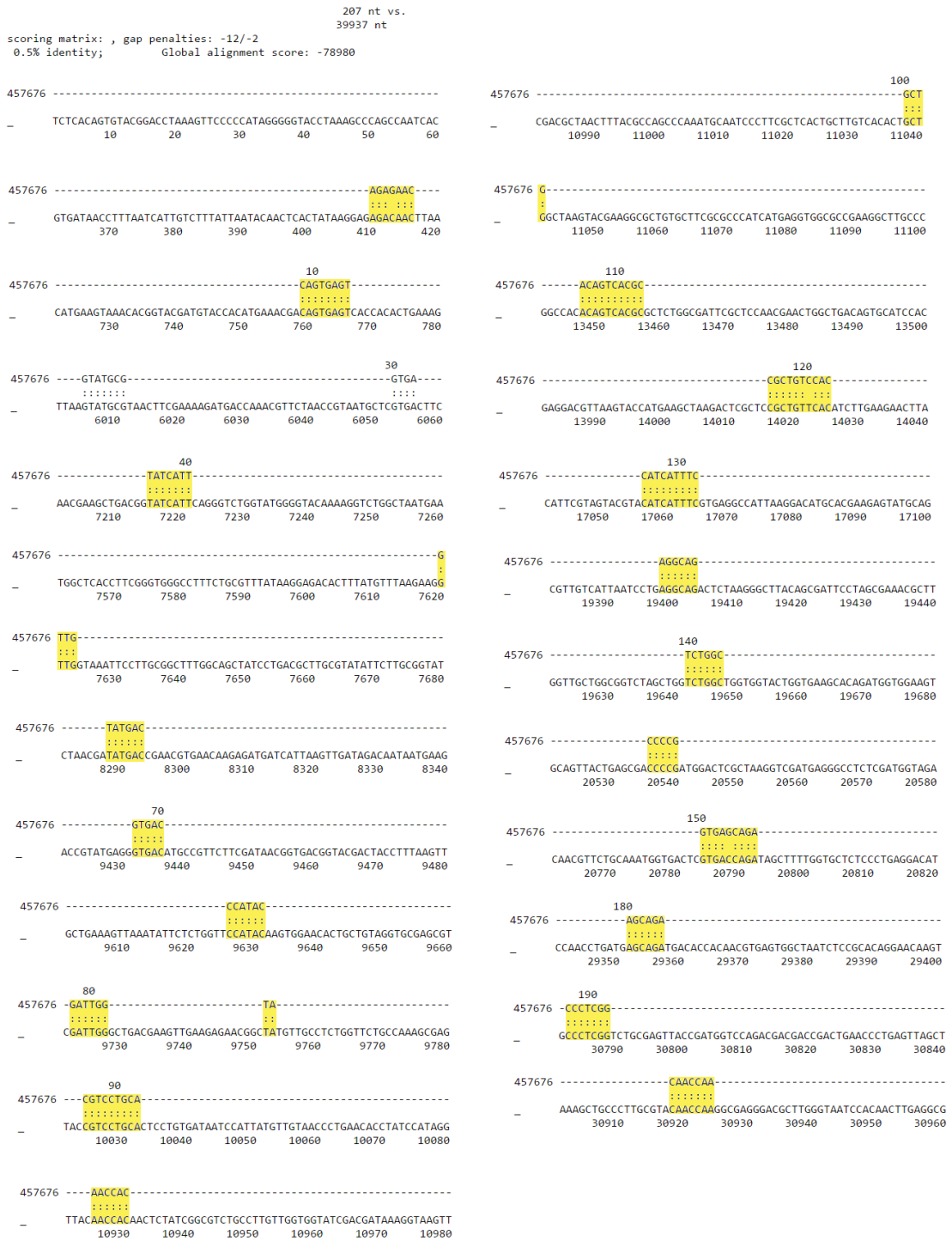
Vytvořeno v programu MEGA7, metoda maximální věrohodnosti.



Obr. 2: Fylogenetický strom - primery Lav.

Vytvořeno v programu MEGA7, metoda Neighbor-joining.

Příloha 6: Srovnání (alignment) sekvencí



Obr. 1: Alignment bakteriofága WhisL1 a *Enterobacteria bacteriofág T7* (shoda 0,5%).

Vytvořeno v programu Institut de Génétique Humaine. Sekvence bakteriofága *Enterobacteria bacteriofág T7* převzata z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information).

364 nt vs.
207 nt

scoring matrix: , gap penalties: -12/-2
36.7% identity; Global alignment score: -178

```

      10      20      30      40      50      60
744525 AAGGTTCTGACGGGACAGGCAGACCGCGTCCGTCTCGGATTGATCGGTGAGGAGCCTCTC
      :                ::: :                : : : : : : : : :
_      AG-----AGAAC-----CAGTGAGTACCAT--A
                                10      20

      70      80      90      100     110     120
744525 CCGATGCGGACGGCACTCCGAACGGCACGGATATGTCCCCTGTCGCTGTTGTGCGCGCTG
      : : : : : :                : : : : : :                : : : : :
_      CGTATGCGGT-----GATAT-----CATTGTTGA-----
                                30      40

      130     140     150     160     170     180
744525 CCTGCGGCATCACTCTTCTCGCCGTTGACCTCGACAAGGACGGCCAGCTGGTGGGCACTC
      : : : : : :                : : : : : :                : : : : :
_      -----AACCCGCTA-----TGACGGCAACGGTGAC--CCATACGATTGGTACGT
                                50      60      70      80

      190     200     210     220     230     240
744525 CCATGGAGAACAACGTCGAGATGAGCTCGCACGATGTTGTTTTCTCGGCCAGCGATTCCG
      : : : : : :                : : : : : :                : : : : :
_      CC-TGCA-AACCACGCTGACAGT-----CACGCCGCTGT-----CCACCATCATTTTCCAG
                                90      100     110     120     130

      250     260     270     280     290     300
744525 GCACTTATACTTTTGGAGCTTCTCTCGTTCACGACGGCCAGACCGATAAGGTTTCCGCCG
      : : : :                : : : : : :                : : : : :
_      GCAGT-----CTGGCCCCGGTGAGCAGACCGAC--CGGTACAGCGT
                                140     150     160     170

      310     320     330     340     350     360
744525 ATCGTCCCGAACTTTACGCTGTCTCTTATGGCTCCGACTCTGTCCAGCGTAACCAGCGG
      : : : : : :                : : :                : : : : :
_      ATACCAGCAGACC-----CTC---GGC-----AACCAACAA
                                180     190     200

744525 GGGG-
      : : : :
_      GGGGA

```

Obr. 2: Alignment Bakteriofága WhisL1 a bakteriofága WhisL2 (shoda 36,7%).

Vytvořeno v programu Institut de Génétique Humaine.

```

>_ WhisL1 (C4E)                207 nt vs.
>_ WhisL4 (O)                  235 nt
scoring matrix: , gap penalties: -12/-2
45.4% identity;      Global alignment score: -65

      10      20      30      40      50      60
491258 AGAGAACCAGTGAGTACCATACGTATGCGGTGATATCATTGTTGAAACCCGCTATGACGG
      :      :  ::  ::  ::  ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  ::  :
_      AT-----TTCTTAAATTA--TAATCGTTTCTA-CTTTATCTAATGCCTTTATGACAT
      10      20      30      40

      70      80      90      100     110
491258 CA-ACGGTGAC-CCATACGATTGGT--ACGTCCTGCAAACCACGCTGACAGTCACGCCGC
      :  :  ::  :  ::  :  ::  :  :  :  :  ::  :  ::  :  :  :  :  :  :
_      GAGATGGTGCTACCATATACTTTGTTTAAGGAGTTTGAACCATACTTACTTT---GCC--
      50      60      70      80      90      100

      120     130     140     150
491258 TGTCCACCATCA---TTTCAGG--CAGTCTGGCCCCCGG-----TGAG-----CAGA
      ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  :  :  :  :  :  :  :  :
_      TGACTTGAATCACTGTTTCTGGTTCACACTTGCAAGTGTACTATTGATGTTCTCTACACA
      110     120     130     140     150     160

      160     170     180     190     200
491258 CCGACCG-GTACA--GC----GTATACCAGCAGACCCTCGGCAACCAACAA----GGGGA
      ::  :  ::  :  ::  :  ::  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
_      TTAACCGTGTCCACTGCTTATGTATTTCAATATTCTCTCCGGAATATAAAATCATGATGA
      170     180     190     200     210     220

491258 -----
_      TGATTACTATT
      230

```

Obr. 3: Alignment Bakteriofága WhisL1 a bakteriofága WhisL4 (shoda 45,4%).

Vytvořeno v programu Institut de Génétique Humaine.

```

>_ WhisL2 (C4B)                                363 nt vs.
>_ WhisL3 (C4D)                                232 nt
scoring matrix: , gap penalties: -12/-2
37.9% identity;          Global alignment score: -194

      10      20      30      40      50      60
199281 AAGGTTCTGACGGGACAGGCAGACCGCGTCCGTCTCGGATTGATCGGTGAGGAGCCTCTC
      : : : :                               : : : :
_      --GTTTGTGT-----ATTTGCC-----CCTATC
                                10          20

      70      80      90      100     110     120
199281 CCGATGCGGACGGCACTCCGAACGGCACGGATATGTCCCGTGTGCTGTTGTGCGCGCTG
      : : : :                               : : : : : :
_      TCGCTG-----GTTTCGC-----CTG
                                30

      130     140     150     160     170
199281 CCTGCGGCATCACTCTTCTCGCCGTTG--ACCTCGACAAGGACGGCCAGCTGGTGGGCAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_      CCTTCGGCAT-----GGAGTTGTTACGCCATAAGG-CAATTAATCGTT--TAA
      40          50          60          70          80

      180     190     200     210     220     230
199281 TCCCATGGAGAACAACGTCGAGATGAGCTC-GCCGATGTTGTTTTCTCGGCCAGCGATT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_      TGAGTTGGA-AACAA-GTCTTTATTTTCGCTGTCCACAT-GTTTTCTT---CATCAAGTT
      90          100         110         120         130

      240     250     260     270     280     290
199281 CGGCACTTATACTTTTGGAGCTTCTCTCGTTCACGACGGCCAGACCGATAAGGTTTCCGC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_      GG-----CTTTTGG-----TAAAAATGGGTCTACACTTTGAGGTTCTGT
      140          150         160         170

      300     310     320     330     340     350
199281 CGATCGCTCCCGAACTTTACGCTGTCTTATGGCTCCGACTCTGTCCAG---CGTAACC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_      C--TTGTTGATG--CTTTCAACTGACACT--TGTATACGACCTTTTCCTATCTCGTATAT
      180         190         200         210         220         230

      360
199281 AGCGGGGGG
      :
_      A-----

```

Obr. 4: Alignment Bakteriofága WhisL2 a bakteriofága WhisL3 (shoda 37,9%).

Vytvořeno v programu Institut de Génétique Humaine.


```

>_ WhisL3 (C4D)                                232 nt vs.
>_ WhisL4 (O)                                  235 nt
scoring matrix: , gap penalties: -12/-2
51.0% identity;          Global alignment score: 63

      10      20      30      40      50
261315 GTTTGTGTATTTGCCCTATCTCGCTGGTTTCGCCTGCCTTC--GGCATGGAGTTGTTAC
      ::: : : ::      : ::      : ::      :::::      : :::: : : : : :
_      ATTTCTAAATTATAATCGTTTCTACTTTATCTAATGCCTTTATGACATG-AGATGGTGC
      10      20      30      40      50

      60      70      80      90      100     110
261315 GCCCATAAGGCAATTAATCGTTTAAATGAGTTGGAAACAAGTCTTTATTTTCGCTGTCCA
      :::::      :: : ::::: :::: : : : : : : : : : : : : : : : :
_      TACCATA-----TACTTTGTTTAAGGAGTTTGAACCA--TACTTACTTTGCCTGACTT
      60      70      80      90      100     110

      120     130     140     150     160     170
261315 ----CATGTTTTCTTCATCAAGTTGGCTTTTGG--TAAAAATGGG-TCTACACTTTGAGG
      :: : ::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_      GAATCACTGTTTCTGGTTCACACTTGCAAGTGTACTATTGATGTTCTCTACACATTAACC
      120     130     140     150     160     170

      180     190     200     210     220
261315 TTCTGTCTTGTTGATGC-TTTCAACTGACACTT--GTATACGACCTTTTCCTATCTCGTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
_      GTGTCCACTGCTTATGTATTTCAATATTCTCTCCGGAATATAAAAATCATGATGATGATTA
      180     190     200     210     220     230

      230
261315 -TATA
      : : :
_      CTATT

```

Obr. 5: Alignment Bakteriofága WhisL3 a bakteriofága WhisL4 (shoda 51%).

Vytvořeno v programu Institut de Génétique Humaine.