

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Výskyt genů kódujících
cyklomoduliny u pacientů s
kolorektálním karcinomem**

Diplomová práce

Natálie Kazdová

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Micenková, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Brno 2020

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Natálie Kazdová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Výskyt genů kódujících cyklomoduliny u pacientů s kolorektálním karcinomem

Studijní program: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Studijní obor: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Vedoucí práce: Mgr. Lenka Micenková, Ph.D.

Akademický rok: 2019/2020

Počet stran: 92

Klíčová slova: Cyklomoduliny; Kolorektální karcinom; Mikrobiom; *Escherichia*; 16S rRNA; Sekvenování nové generace; Bakteriální kolonizace

Bibliographic Entry

Author: Bc. Natálie Kazdová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Prevalence of cyclomodulin-encoding genes in patients with colorectal carcinoma

Degree programme: Bioanalytical Laboratory Diagnostics in Medicine – Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Field of Study: Bioanalytical Laboratory Diagnostics in Medicine – Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: Mgr. Lenka Micenková, Ph.D.

Academic Year: 2019/2020

Number of Pages: 92

Keywords: Cyclomodulins; Colorectal carcinoma; Microbiome; *Escherichia*; 16S rRNA; Next-generation sequencing; Bacterial colonization

Abstrakt

Kolorektální karcinom je jednou z nejčastěji se vyskytujících rakovin v západním světě. Mikrobiom kolonizující střevo může vést k rozvoji různých onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu. Bakterie mohou ovlivňovat vývoj onemocnění svými metabolity, invazí do epitelálních buněk nebo interakcemi s imunitními buňkami. Je snaha objevit markery, které jsou spojené s výskytem kolorektálního karcinomu. Hlavním cílem mé diplomové práce tedy byla detekce bakteriálních toxinů a cyklomodulinů, které mohou ovlivňovat rozvoj kolorektálního karcinomu, konkrétně byly vybrány koliciny E1 a E1* a cyklomoduliny *cnf-1*, *cdt* a *pks*. Součástí bylo také hledání souvislostí mezi těmito geny a bakteriální kompozicí. Získané výsledky byly porovnány se skupinou zdravých jedinců. Téměř u poloviny analyzovaných rodů a tří genů bylo nalezeno rozdílné zastoupení mezi vzorky stolice od pacientů a zdravých jedinců.

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common cancers in the Western world. The microbiome that colonizes the intestine can lead to the development of various diseases, including colorectal cancer. Bacteria can influence the development of the disease by their metabolites, by invading epithelial cells or by interactions with immune cells. There is an effort to discover markers that are associated with the occurrence of colorectal cancer. The main goal of my diploma thesis was the detection of bacterial toxins and cyclomodulins that can affect the development of colorectal cancers, specifically selected colicins E1 and E1* and cyclomodulins *cnf-1*, *cdt*, and *pks*. It also included finding connections between these genes and the bacterial composition. The obtained results were compared with a group of healthy individuals. In almost half of the analysed genera and three genes, a different proportion was found between stool samples from patients and healthy individuals.

ZADÁNÍ
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2019/2020

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Studentka:	Bc. Natálie Kazdová
Program:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Obor:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Výskyt genů kódujících cyklomoduliny u pacientů s kolorektálním karcinomem
Název práce anglicky:	Prevalence of cyclomodulin-encoding genes in patients with colorectal carcinoma

Oficiální zadání:

Kolorektální karcinom je třetí nejčastější rakovinou v západním světě a je na druhém místě co do příčin nádorových úmrtí. Práce se zaměří na detekci bakteriálních toxinů a efektorů (cyklomodulinů), které zasahují do eukaryotického buněčného cyklu ve vzorkách získaných od pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem. Budou vyšetřeny vzorky odebrané přímo z nádoru, z přilehlé nádorové oblasti a ze stolice pacientů. Diplomová práce bude zaměřena na literární rešerši dostupných informací o cyklomodulinech a na optimalizaci PCR a qPCR. Dále budou hledány souvislosti mezi výskytem cyklomodulinů a bakteriální kompozicí vzorků od pacientů získanou pomocí sekvenace 16S rRNA. Výsledky budou porovnány s fekální mikroflórou skupiny zdravých jedinců.

Jazyk závěrečné práce:	čeština
Vedoucí práce:	Mgr. Lenka Micenková, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Eva Budínská, Ph.D.
Datum zadání práce:	4. 10. 2018
V Brně dne:	28. 8. 2019

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

.....
Bc. Natálie Kazdová
studentka

.....
Mgr. Lenka Micenková, Ph.D.
vedoucí práce

.....
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální biologie

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí Mgr. Lence Micenkové, PhD. za pomoc, cenné rady, věnovaný čas, trpělivost při konzultaci k mé diplomové práci, i za významné přispění k praktické části.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány. Text práce jsem vypracovala podle pravidel a zodpovídám za jeho jazykovou správnost.

Brno 12. června 2020

.....
Natálie Kazdová

Obsah

1. Úvod a problematika	13
1. 1. Střevní mikrobiom	13
1. 1. 1. Detekce složení střevního mikrobiomu	15
1. 1. 2. Interakce bakterií s hostitelem	16
1. 2. Kolorektální karcinom	16
1. 3. Střevní mikrobiom a kolorektální karcinom	17
1. 3. 1. Působení prostřednictvím metabolismu	19
1. 3. 2. Vliv na léčbu	20
1. 3. 3. <i>Escherichia coli</i>	21
1. 3. 4. <i>Fusobacterium nucleatum</i>	22
1. 3. 5. <i>Bacteroides fragilis</i>	23
1. 4. Cyklomoduliny	23
1. 4. 1. Cytotoxický nekrotizující faktor	26
1. 4. 2. Cytoletální distendující toxin	28
1. 4. 3. Kolibaktin	28
1. 4. 4. Cyklus inhibující faktor	30
1. 4. 5. Ostatní cyklomoduliny	31
1. 5. Koliciny	32
1. 5. 1. Kolicin E1	33
2. Cíle	34
3. Vymezení autorských podílů	35
4. Materiál a metody	36
4. 1. Protokol přípravy knihovny a sekvenace genu pro 16S rRNA	39
4. 1. 1. Izolace DNA	39
4. 1. 2. Měření koncentrace genomické DNA	40
4. 1. 3. Amplifikace genu pro 16S rRNA	40
4. 1. 4. Kontrola kvality DNA po amplifikaci	43

4. 1. 5. Přečištění amplikonů	43
4. 1. 6. Fluorimetrické stanovení koncentrace.....	44
4. 1. 7. Rozdělení vzorků do poolů před indexací	44
4. 1. 8. Indexační PCR.....	44
4. 1. 9. Přečištění produktů po indexační PCR a měření koncentrace.....	44
4. 1. 10. Sekvenace DNA	45
4. 1. 11. Bioinformatické zpracování dat.....	45
4. 2. Klonování	45
4. 2. 1. PCR.....	46
4. 2. 2. Štěpení plazmidového vektoru	47
4. 2. 3. Ligace genu do vektoru	48
4. 2. 4. Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> rekombinantní DNA	48
4. 2. 5. Izolace plazmidové DNA <i>E. coli</i>	48
4. 3. Kvantitativní PCR	48
4. 3. 1. Příprava standardů pro absolutní kvantifikaci	48
4. 3. 2. Kvantifikace pomocí qPCR.....	49
4. 4. Statistické vyhodnocení	50
5. Výsledky	Chyba! Záložka není definována.
5. 1. Výsledky sekvenace	Chyba! Záložka není definována.
5. 1. 1. Výsledky sekvenace pro vzorky stolice.....	Chyba! Záložka není definována.
5. 1. 2. Výsledky sekvenace pro všechny typy vzorků	Chyba! Záložka není definována.
5. 2. Výsledky kvantitativní PCR.....	Chyba! Záložka není definována.
5. 3. Bakteriální profil a kvantitativní PCR.....	Chyba! Záložka není definována.
6. Diskuze	Chyba! Záložka není definována.
6. 1. Metody.....	Chyba! Záložka není definována.
6. 2. Analýza bakteriální kompozice	Chyba! Záložka není definována.
6. 2. 1. Stolice zdravých jedinců.....	Chyba! Záložka není definována.
6. 2. 2. Stolice pacientů	Chyba! Záložka není definována.

6. 2. 3. Tumor a stěr ze zdravé tkáně.....	Chyba! Záložka není definována.
6. 3. Gen pro β -glukuronidázu.....	Chyba! Záložka není definována.
6. 4. Kvantitativní PCR	Chyba! Záložka není definována.
7. Závěr.....	51
8. Summary.....	52
9. Literatura	53
10. Přílohy	63
10. 1. Příloha 1 – Izolace DNA ze stěrů stolice / sliznice kolon	63
10. 2. Příloha 2 – Horizontální systém pro elektroforézu.....	64
10. 3. Příloha 3 – První kolo amplifikace 16S rRNA	65
10. 4. Příloha 4 – Clean up po 1. kole PCR.....	66
10. 5. Příloha 5 – Indexační PCR	67
10. 6. Příloha 6 – Clean up po indexaci.....	68
10. 7. Příloha 7 – Přečištění PCR produktů.....	69
10. 8. Příloha 8 – Transformační protokol pro buňky <i>E. cloni</i> 10G.....	70
10. 9. Příloha 9 – Izolace plazmidové DNA.....	71

Seznam zkratek

AOM/DSS – azoxymethan/dextranulfát sodný

ATG16L1 – autophagy related 16 like 1

Caco-2 – kontinuální linie heterogenních lidských epiteliálních buněk

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

Cdc42 – kontrolní protein buněčného dělení 42 homolog (z angl. cell division control protein)

Cdk1, Cdk4 – cyklin-dependentní kináza

CDT – cytoletální distendující toxin

Cif – cyklus inhibující faktor

CNF – cytotoxický nekrotizující faktor

CoPEC – *Escherichia coli* produkující kolibaktin (z angl. colibactin-producing *Escherichia coli*)

CRC – kolorektální karcinom (z angl. colorectal cancer)

CTxA1 – toxický řetězec CTx A1 (z angl. CTx A1 toxic chain)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)

DNT – dermonekrotický toxin

EBNA – Epstein-Barrové nukleární antigen

EBV – Epstein-Barrové virus

EHEC – enterohemoragická *Escherichia coli*

EPEC – enteropatogenní *Escherichia coli*

ERAD – degradace spojená s endoplazmatickým retikulem (z angl. endoplasmic reticulum associated degradation)

ERK – extracelulární signálně regulované kinázy

ETBF – enterotoxigenní *Bacteroides fragilis*

ExPEC – extraintestinální patogenní *Escherichia coli*

FIP – imunosupresivní protein

gDNA – genomická DNA

Gln – glutamin

Grb2 – protein vázaný na receptor růstového faktoru 2 (z angl. growth factor receptor-bound protein 2)

HCT-116 – buněčná linie pocházející z lidského karcinomu tlustého střeva

HEK-293 – lidské embryonální buňky ledvin 293 (z angl. human embryonic kidney 293 cells)

HeLa – buněčná linie lidských epiteliálních buněk

HPV – lidský papilomavirus (z angl. human papilloma virus)

HSV – *herpes simplex virus*

IBD – zánětlivé onemocnění střev (z angl. inflammatory bowel disease)

IEC – střevní epiteliální buňky (z angl. intestinal epithelial cells)

IEC-6 – buněčná linie krysích epiteliálních buněk

IL – interleukin

JAK2 – Janus kináza 2

JCV – JC virus

LEE – lokus pro enterocytové vyhlazení (z angl. locus of enterocyte effacement)

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy (z angl. mitogen-activated protein kinases)

MEK – mitogenem aktivovaná proteinová kináza

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)

PD-L1, PD-L2 – ligand programované buněčné smrti (z angl. programmed death-ligand)

PIK3Ca – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinázová katalytická podjednotka alfa (z angl. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha)

PMT – *Pasteurella multocida* toxin

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative polymerase chain reaction)

pRB – retinoblastomový protein

RT – pokojová teplota (z angl. room temperature)

RTA – řetězec ricin A (z angl. ricin A chain)

SHP-2 – Src homologní oblast 2 obsahující protein tyrosin fosfatázu 2 (z angl. Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2)

T3SS, T4SS – systém sekrece proteinů typu 3 nebo 4

TNF – tumor nekrotizující faktor

UPEC – uropatogenní *Escherichia coli*

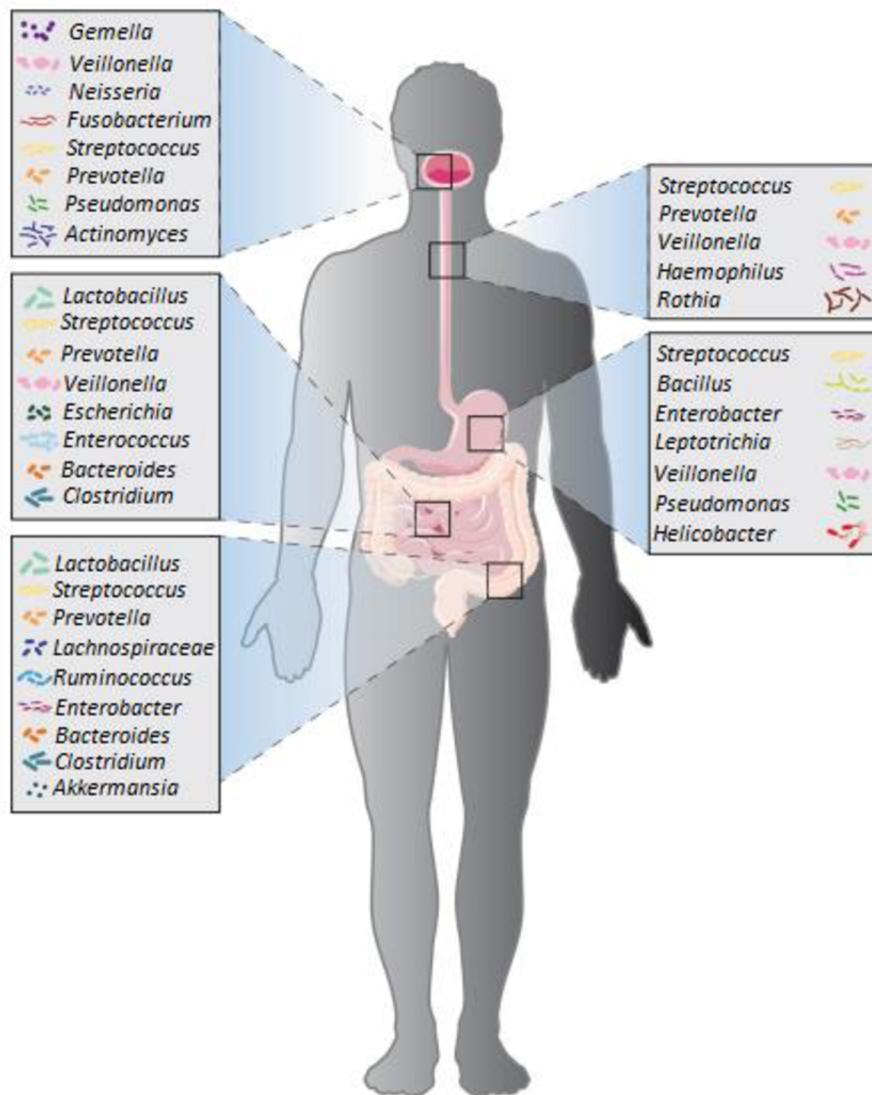
1. Úvod a problematika

1. 1. Střevní mikrobiom

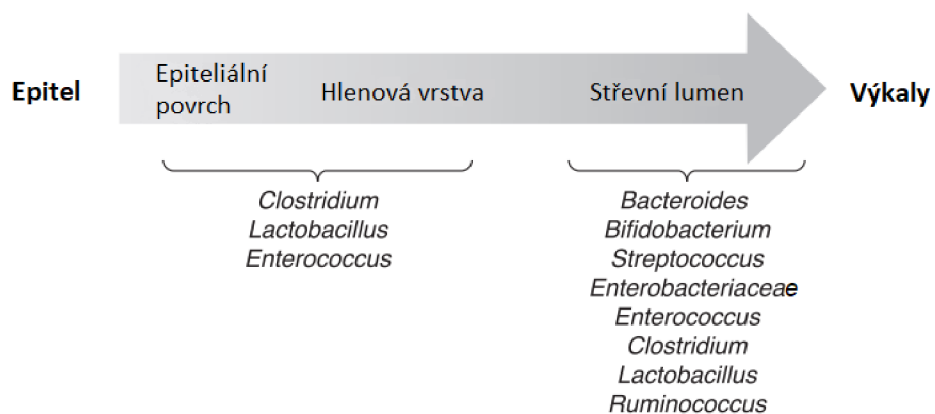
Pojmem mikrobiom označujeme buď kolektivní genomy mikroorganismů sídlících v nějakém prostředí, nebo samotné mikroorganismy. Synonymní pojem mikrobiota popisuje ekologické komunity komenzálních, symbiotických a patogenních agens nacházejících se v organismech. Mikrobiom působí na hostitele příznivě i škodlivě, čímž přispívá ke zdraví nebo nemoci (Sekirov *et al.*, 2010).

Střevní mikrobiom spolupracuje s hostitelem jako „metabolický orgán“, který reguluje trávicí, metabolické a imunitní funkce a podporuje eubiózu (mikrobiální rovnováhu v těle). Složení lidského mikrobiomu se napříč gastrointestinálním traktem liší (obrázek 1). Jídlo je transportováno jícnem z ústní dutiny do žaludku. Díky kyselému prostředí žaludku je růst mnoha bakterií inhibován. Žaludek pomalu vyprazdňuje svůj obsah do tenkého střeva. Svaly tenkého střeva míchají potravu s trávicími šťávami ze slinivky břišní, jater a střeva a tlačí směs dopředu pro další trávení. Za absorpci živin je potom zodpovědné *jejunum* a *ileum*, konkrétně jejich střevní epitel. Epitel absorbuje vodu a trávené živiny a přemísťuje je do krevního řečiště. Stolicí tvoří odpadní produkty z trávicího procesu – nestrávené části potravin, tekutin a starší buňky z epitelu trávicího traktu.

Frank *et al.* (2007) popsali, že jsou v tenkém a tlustém střevě zdravých jedinců různé bakteriální skupiny v jiném zastoupení. Vzorke z tenkého střeva byly obohaceny o *Bacilli* z kmene *Firmicutes* a *Actinobacteria*. V tlustém střevě obvykle převládají *Firmicutes*. Kromě podélné heterogenity, kterou vykazuje střevní mikrobiom, existuje také velké množství příčné variability ve složení mikrobiomu (obrázek 2; Sekirov *et al.*, 2010). Komunita, která je v úzkém kontaktu s mukózou se totiž liší od intraluminálního mikrobiomu. Je tedy otázkou, zda samotný fekální mikrobiom dostatečně odráží mukózní události, aby bylo možné využít stolici k hledání nějakých příčinných souvislostí.



Obrázek 1: Převládající bakteriální rody v ústní dutině, jícnu, žaludku, tenkém a tlustém střevě (Ruan et al., 2020)



Obrázek 2: Příčné odchylky v mikrobiální kompozici ve střevě (Sekirov et al., 2010)

V přirozeném prostředí se bakterie nevyskytují v podobě izolovaných buněk, ale v podobě biofilmu. Biofilm je strukturované mikrobiální společenství, uložené v mezibuněčné hmotě a adherující k povrchům. Smíšené bakteriální populace biofilmů (některé aktivní, jiné spící a stacionární a jiné rezistentní na antimikrobiální látky) mimo jiné podporují vyhýbání se obraně hostitele (Domingue *et al.*, 2020). Biofilmy byly již dříve popsány u chronických infekcí cystické fibrózy a chronické obstrukční plicní nemoci. Ovšem ne všechny biofilmy jsou patogenní, mukózní tkáně (například dýchací cesty a gastrointestinální trakt) poskytují rozmanité nutriční prostředí pro tvorbu biofilmu. Muciny vrstev hlenu vážou a zachycují molekuly vody, aby zakryly epitel a vytvořily difúzní bariéru, která: 1) udržuje epiteliální povrch „čistý“; a 2) chrání epitel před nepřátelskými poškozeními. Rychlý obrat hostitelského hlenu a epitelu ve střevech jsou překážkami, které omezují rozsáhlou kolonizaci a tvorbu biofilmu na tomto epitelovém povrchu, navíc jeho vrchní vrstvu neustále narušuje posun stolice.

1. 1. 1. Detekce složení střevního mikrobiomu

Ke zjištění složení střevního mikrobiomu lze využít několik metod. Nejdříve se využívala kultivace, ta je ovšem časově náročná a většina střevních bakterií je obtížně kultivovatelná. Dále se začaly postupně využívat moderní molekulární přístupy – restriční analýzy, metody *in situ* hybridizace a sekvenování DNA. K prozkoumání střevního mikrobiomu a identifikaci a klasifikaci bakterií se dnes běžně používají 16S ribozomální RNA a metagenomické studie ze stolice nebo tkání trávicího traktu. Přístup kombinující bioinformatiku a analýzu expresí různých genových klastrů může rychle rozšířit naše znalosti metabolického potenciálu mikrobiomu a zároveň se vyhnout výzvám pěstování náročných komensálů (Guo *et al.*, 2017).

Byl také představen nový přístup využití mikroskopu a termín „mikroskomika“ tak může doplňovat předchozí „omiky“, jako je „kulturomika“, „proteomika“ a „metagenomika“ (Yimagou *et al.*, 2020). Ve své práci Yimagou *et al.* vytvořili repertoár rozmanitých objektů založený na morfologických vlastnostech. Příkladem jsou třeba vlnité membránové objekty, které byly nalezeny u kultivované *E. coli* a *Lactobacillus ruminis*.

Mikroskomický přístup také naznačuje, že grampozitivní populace je hojnější než to, co bylo ukázáno konvenčním gramovým barvením nebo metagenomickým profilováním: poměr mezi průměrným výskytem grampozitivních a gramnegativních bakterií mezi 8 analyzovanými vzorky stolice byl pro gramovo barvení 1,6, pro metagenomiku 2,3 a pro mikroskomiku 3,0

(Yimagou *et al.*, 2020). Mikroskopika tak může poskytovat metodu pro přímou detekci variací mezi jednotlivci.

1. 1. 2. Interakce bakterií s hostitelem

Komenzální bakterie ve střevech jsou nezbytné pro lidskou fyziologii, neboť dodávají rozmanitost metabolických funkcí, která by nebyla pouze hostitelským genomem dostupná. Střevní bakterie napomáhají trávení mnoha složek potravy (včetně jinak nestravitelných, například polysacharidů rostlin), regulují ukládání tuků v hostiteli, stimulují imunitní systém a pomáhají chránit hostitele před působením patogenů (Bäckhed *et al.*, 2005; Eckburg *et al.*, 2005; Sekirov *et al.*, 2010).

K řízení základních biosyntetických buněčných reakcí je zapotřebí řada esenciálních vitamínů a minerálů, souhrnně známých jako mikroživiny. Pomocí organismů *Caenorhabditis elegans*-*E. coli* (fungujících jako systém hostitel-mikrob) bylo odhaleno několik bakteriálních mechanismů, které hrají roli při účinném doplňování mikroživin, a to buď absorpcí a metabolismem na snadněji vstřebatelný derivát (kyselina listová), nebo sekrecí sideroforů (železo a B12) (Maynard *et Weinkove*, 2020). Tyto mechanismy způsobují, že mikronutrient je pro hostitele biologicky dostupnější, ale v případě kyseliny listové může mít za určitých podmínek negativní důsledky pro dlouhodobé zdraví. Předpokládá se také, že bakterie soutěží s hostitelem o příjem železa. Porozumění těmto interakcím pomůže navrhnout účinnější zásahy, které zvýší absorpci mikroživin v gastrointestinálním traktu.

1. 2. Kolorektální karcinom

CRC je vývoj rakoviny z tlustého střeva nebo konečníku (části tlustého střeva). Je to komplexní onemocnění, které je ovlivněno jak genetickými, tak environmentálními faktory (příkladem jsou stravovací návyky a životní styl). CRC je po rakovině plic a prostaty třetí nejčastěji diagnostikovanou malignitou u mužů a druhou nejčastější malignitou po rakovině prsu u žen (Ferlay *et al.*, 2019). V roce 2012 se 15,4 % nových výskytů rakoviny dalo přičíst karcinogennímu působení infekcí (Plummer *et al.*, 2016).

1. 3. Střevní mikrobiom a kolorektální karcinom

Přibývající důkazy ukazují, že existuje úzká souvislost mezi střevní mikrobiální nerovnováhou a genézí CRC. Bylo prokázáno, že změny ve střevním mikrobiomu mohou přímo přispět k tumorigenezi. Strava s vysokým obsahem tuku významně změnila strukturu střevního mikrobiomu a podpořila genezi CRC u mutantních *K-ras* myši (Schulz *et al.*, 2014). Axenické myši (bez zárodků) kolonizované fekálním mikrobiomem z myši ošetřených AOM/DSS a nesoucích nádor vykazovaly významně zvýšenou tumorigenezi v tlustém střevě ve srovnání s těmi, které byly kolonizovány střevním mikrobiomem z neošetřených zdravých myši (Zackular *et al.*, 2013).

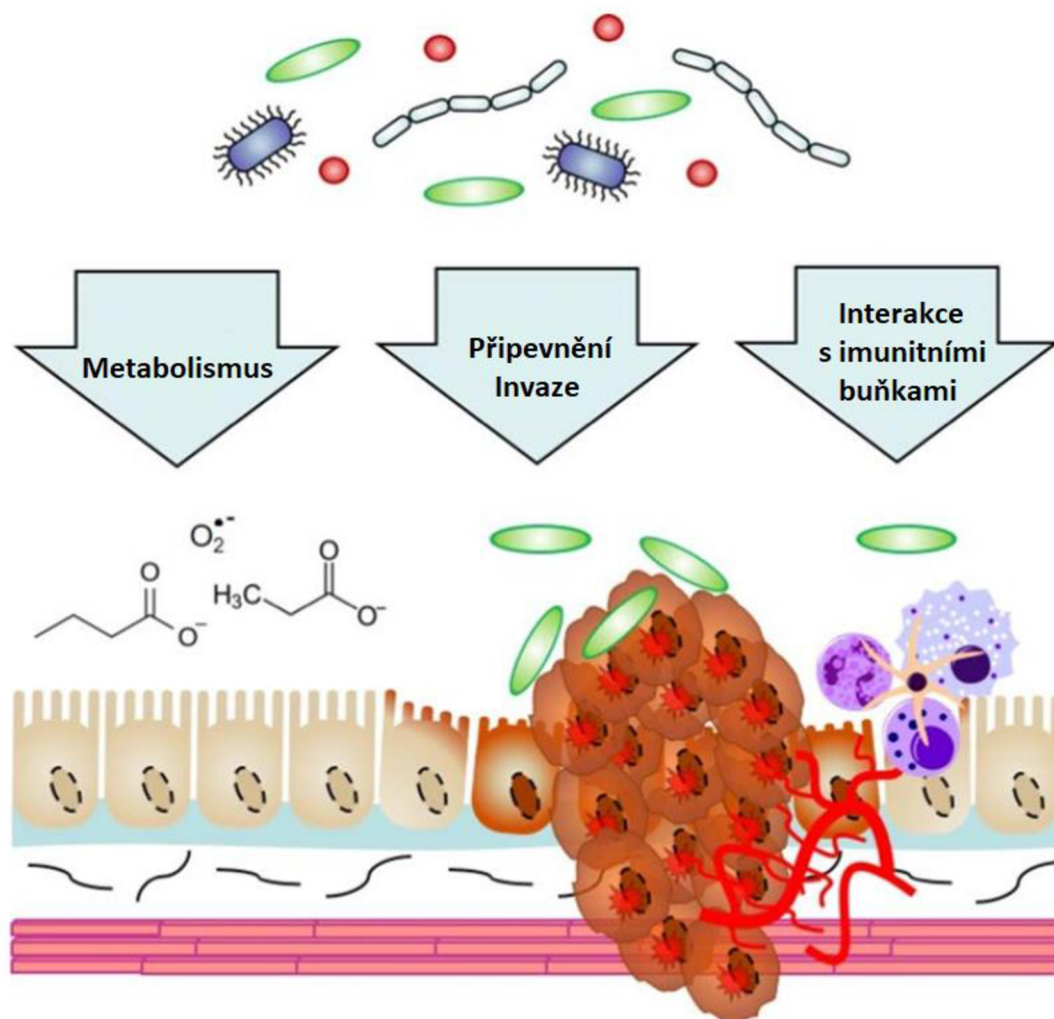
V tabulce 1 jsou uvedeny eukaryotické viry spojené s onkogenezi ve střevech. Tyto viry by mohly být konceptualizovány jako hnací faktory karcinogeneze, zatímco ostatní virové komunity buď usnadňují chronickou infekci vedoucí k rakovině, nebo jí naopak brání (Emlet *et al.*, 2020). Analýza virových dat je však komplikována jejich vysokou mírou rekombinace a horizontálním přenosem genů a / nebo přeskupením genomických segmentů.

Viru	Virový podtyp	Mechanismus účinku
HPV	HPV-16, možná HPV-18 a HPV-45	U pacientů s rakovinou děložního čípku integrace virové DNA do hostitelského genomu následně umožňuje virovým onkogenům zastavit buňku v S-fázi, zejména prostřednictvím downregulace tumorsupresorových genů, jako jsou <i>p53</i> a <i>Rb</i> . Předpokládá se, že tento mechanismus zůstává stejný v případech CRC.
Lidský polyomavirus	Polyomavirus JCV a BK	Polyomaviry kódují T-antigen, nestrukturální onkogenní protein, který je schopen inaktivovat nádorové supresorové proteiny <i>p53</i> a <i>pRB</i> , což opět nutí buňku do S-fáze, aby se umožnila replikace virového genomu. Kromě toho může inaktivace <i>p53</i> a <i>pRB</i> vést k nestabilitě genomu.
Lidské herpesviry	HSV2, cytomegalovirus	Tyto viry kromě podpory antiapoptické aktivity aktivací dráhy <i>Ras / Raf-1 / MEK / ERK</i> také indukují syntézu DNA. Jiné herpesviry indukují karcinogenezi prostřednictvím inhibice nádorových supresorových proteinů, jako je <i>p53</i> , nebo v případě cytomegaloviru inhibicí opravy poškození DNA.
Virus Epstein-Barr	Nedostupné	Infekce EBV vede k produkci jaderných antigenů EBV (EBNA1 a EBNA2), které následně vedou k mutacím <i>PIK3Ca</i> , hypermetylaci DNA, amplifikaci <i>JAK2</i> a nadměrnou expresi <i>PD-L1</i> a <i>PD-L2</i> .

Parvoviry	Lidský bocavirus	Role tohoto viru v onkogenezi není v současné době známa, ale předpokládá se zapojení do karcinogeneze a perzistence nádorů díky své přítomnosti v perzistentních nádorech.
<i>Orthobunyavirus</i>	Nedostupné	Role tohoto viru v karcinogenezi není v současné době známa, ale ve studiích zkoumajících viry CRC byl zjištěn nejvyšší výskyt tohoto eukaryotického viru.
Viry hepatitidy	Hepatitis B	Protein X viru hepatitidy B se může vázat na nádorový supresor <i>p53</i> , což umožňuje, aby buňka zůstala v S-fázi.

Tabulka 1: Eukaryotické viry spojené s onkogenezí ve střevech (Emlet *et al.*, 2020)

CRC představuje komplexní asociace nádorových buněk, ne-neoplastických buněk (např. stromálních buněk) a velkého počtu mikroorganismů. Bakterie mohou ovlivnit vývoj CRC přímým nebo nepřímým dopadem na hostitelské buňky nebo na jejich přidružené mikroprostředí (obrázek 3; Ternes *et al.*, 2020). Bakterie mohou poškozovat hostitele prostřednictvím svého metabolismu a jeho sekretovaných molekul, například produkcí toxinů a extracelulárního superoxidu, aktivací prokarcinogenů a syntézou karcinogenních a genotoxických látek (Kohoutová *et Bureš*, 2013; Ternes *et al.*, 2020). Dále mohou bakterie poškozovat epitel svého hostitele přichycením k němu, invazí a následnou translokací (Ternes *et al.*, 2020). Mezi schopnosti bakterií patří také modulace obrany hostitele (např. interakce bakterií s imunitními buňkami).



Obrázek 3: Potenciální interakce bakterie-hostitel u CRC (Ternes *et al.*, 2020)

Bylo zjištěno, že prozánětlivé geny podporují kolonizaci patogenních kmenů bakterií. Ačkoli přítomnost těchto genů byla rozpoznána u patogenních kmenů bakterií, práce Gómez-Morena *et al.* (2014) je jednou z prvních prokazujících, že se tyto geny nalézají i v normální komenzální flóře. Testování těchto genů by mohlo být užitečné při zkoumání vztahu mezi přítomností prozánětlivých genů a střevních onemocnění. U pacientů s IBD je zvýšené riziko vzniku CRC (Eaden *et al.*, 2001).

1. 3. 1. Působení prostřednictvím metabolismu

Mikrobiom uvnitř tlustého střeva poskytuje příležitost kvašení řady látek z potravy, které nejsou úplně stráveny a absorbovány v tenkém střevě. Mikrobiom může být modulován několika složkami potravy (např. komplexními uhlohydráty). Mikrobiální enzymy, včetně nitroreduktáz, azoreduktáz, hydroláz a β -glukuronidázy, mohou převádět neaktivní sloučeniny

na aktivní metabolity, což může mít nepříznivé i příznivé účinky. Bakterie mohou také ze složek stravy vytvářet nové metabolity, které jsou více biologicky aktivní (tabulka 2).

Složka potravy	Zdroje potravin	Bakteriální metabolit
Vláknina	Zrna / obilné výrobky	Butyrát
Kyselina linolová	Rostlinné oleje	Konjugovaná kyselina linolová
Daidzein	Sója	Equol
Secoisolariciresinol	Lněné semínko, sezam	Enterolakton, enterodiol
Isoxanthohumol	Chmel / produkty pocházející z chmele, jako je pivo	8-prenylnaringenin
Kyselina ellagová	Jahody, maliny, vlašské ořechy, granátová jablka	Urolithiny A a B

Tabulka 2: Bakteriální metabolity z potravinových složek s vlastnostmi prevence rakoviny (Davis *et al.*, 2009)

Výzkumy odhalily potenciál probiotik, prebiotik a synbiotik ke snížení produkce toxických metabolitů ve střevech. Například důkazy ze studie provedené Lee *et al.* (2006) ukazují, že fenolika obsažená v čaji pravděpodobně zvýhodní hostitele inhibicí růstu patogenů a lze je proto považovat za probiotika.

1. 3. 2. Vliv na léčbu

Bakteriální flóra u pacientů s CRC se významně liší ve srovnání se zdravými lidmi (Palmisano *et al.*, 2020). Přítomnost předoperačních agresivních bakterií a nedostatek ochranných kmenů posílily hypotézu, že by zvláštní složení mikrobiomu mohlo představovat rizikový faktor výskytu anastomotického úniku. Anastomotické netěsnosti jsou definovány jako „únik lumenálního obsahu z chirurgického spojení“. Jsou to nejdůležitější komplikace, které je třeba poznat po gastrointestinálním chirurgickém zákroku.

Aktivita střevních bakterií může také způsobovat průjem během chemoterapie kvůli reaktivaci chemoterapeutického CPT-11 (běžné chemoterapeutikum používané pro léčbu CRC) ve střevech pomocí β -glukuronidázy (Wallace *et al.*, 2010). Těmto nežádoucím účinkům lze zabránit použitím antibiotik nebo navržením léků tak, aby se zvýšila chemoterapeutická účinnost.

1. 3. 3. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie, která kolonizuje gastrointestinální trakt lidí a zvířat. *E. coli* jsou normálně přítomny v dolním střevním traktu zdravých lidí a zvířat (komezální kmeny), ale existují také patogenní střevní (intestinální) a mimo-střevní (extraintestinální) kmeny. Komezální kmeny se podílí na podpoře stability lumenální mikrobiální flóry a na udržování normální střevní homeostázy. Patogenní kmeny jsou spojeny s celou řadou patologických stavů, včetně průjmu, hemolyticko-uremického syndromu, infekce močových cest, respirační infekce, sepse, infekce ran, novorozenecké meningitidy a kolorektálního karcinomu. Já se ve své práci budu zaměřovat na kmeny *E. coli*, které jsou pro člověka patogenní. V každé podskupině existuje fylogenetická rozmanitost (genetická složka taxonomické rozmanitosti) *E. coli*. Kmeny *E. coli* jsou rozděleny do čtyř hlavních fylogenetických skupin – A, B1, B2 a D.

Hranice mezi komensalismem a parazitismem se zdá být tenká. Při porovnání složení genomu jednoho nepatogenního probiotického kmene *E. coli* O6 s dvěma uropatogenními izoláty UPEC O6 je zřejmé, že je obtížné definovat skutečné virulentní faktory ExPEC a může záviset na prostředí nebo podmínkách růstu, aby se ukázalo, zda určité fitness faktory mohou také podporovat virulenci (Grozdanov *et al.*, 2004).

Zatímco základní genový fond je zachován a je vyžadován pro základní buněčné funkce, flexibilní genový fond je variabilní, někdy kmenově specifický a důležitý pro přizpůsobení zvláštním růstovým podmínkám, např. kolonizaci nových ekologických nik, symbiózu, interakci hostitel-buňka a patogenitu. Patogenní kmeny obsahují různé kombinace genů virulence a ostrovů patogenity, které podporují invazi a kolonizaci, vyhýbání se obraně hostitele a poškození hostitelských tkání. Bylo například popsáno, že EPEC snižuje expresi klíčových proteinů (MSH2 a MLH1) opravujících nesprávné párování bází (mismatch repair) v DNA (Maddocks *et al.*, 2009).

V roce 2017 byl objeven atypický případ nově diagnostikované rakoviny tlustého střeva, který poskytl nahlédnutí do infekčních predispozic bakterie *E. coli* k rozvoji adenokarcinomu tlustého střeva (Patel *et al.*, 2017). Autoři této kazuistiky doporučovali, že u pacientů s recidivující bakterií *E. coli* by měla být prováděna kolonoskopie s cílem vyhledat rakovinu tlustého střeva.

Patogenní *E. coli* může produkovat mnoho toxinů včetně cyklomodulinů, které se podílí na tumorigenezi. Studie bakterií *E. coli* u pacientů s CRC nebo divertikulózou ukázala, že (1)

kmeny *E. coli* patřící k fyloskupině B2 kolonizují vzorky CRC častěji než vzorky divertikulózy, a (2) vzorky z CRC odebrané z distální části byly častěji kolonizovány B2 *E. coli* produkující cyklomoduliny než vzorky divertikulózy (Buc *et al.*, 2013).

Polypy (a v menší míře sousední tkáň) přispívají k novým místním podmínkám prostředí, které indukují adaptaci přidružené *E. coli* nebo výběr izolátů nesoucích specifické rysy potřebné k nejlepšímu zapadnutí do těchto lézí (Ambrosi *et al.*, 2019). Studie Buc *et al.* (2013) prokázala vysokou prevalenci B2 *E. coli* produkující cyklomoduliny v biopsiích rakoviny tlustého střeva, zejména v distální části. Prognostické faktory v CRC závisí především na morfologických a histologických výsledcích. *E. coli* B2 produkující kolibaktin byla častější ve sliznici pacientů s pokročilým stadiem III / IV CRC oproti pacientům se stadiem I CRC (Bonnet *et al.*, 2014). Buc *et al.* (2013) však také pozorovali, že *E. coli* patřící do fyloskupin A a D, a které postrádají známý cyklomodulin, vykazují genotoxickou aktivitu na hostitelské buňky a měly by být považovány za potenciálně škodlivé.

Ukázalo se také, že různé endogenní rysy proximálního a distálního tlustého střeva a jejich různá citlivost na exogenní faktory pravděpodobně vedou ke vzniku specifických bakteriálních populací, které mohou ovlivnit karcinogenezi (Buc *et al.*, 2013). Mechanismus, kterým kmeny *E. coli* produkující cyklomoduliny může podporovat karcinogenezi, pravděpodobně není způsoben pouze samotnou bakterií, ale velmi pravděpodobně zahrnuje řadu dalších faktorů (jako je například citlivost hostitele).

1. 3. 4. *Fusobacterium nucleatum*

Jewett *et al.* (2000) prokázali, že *F. nucleatum*, anaerobní orální bakterie, významně způsobuje smrt imunitních efektorů. Navíc ukázali, že *F. nucleatum* je schopno indukovat smrt buněk apoptózou v mononukleárních buňkách periferní krve a v Jurkat T-buňkách. Huynh *et al.* (2011) zkoumali roli agregace v apoptóze imunitních buněk. Schopnost *F. nucleatum* agregovat buňky může mít důležité důsledky pro bakteriální patogenezi, proto může být zacílení buněčné agregace jako léčebné strategie prospěšné pro přežití a pro zvýšení funkce buněk. Předpokládali, že pokud by byla narušena agregace imunitních buněk zprostředkovaná *F. nucleatum*, byla by indukce apoptózy v imunitních buňkách vlivem *F. nucleatum* zrušena.

FadA virulenční faktor kódovaný bakteriemi rodu *Fusobacterium* má roli v adhezi k epitelovým buňkám a následné invazi do nich, čímž podporuje zánětlivé a proonkogenní odpovědi a stimulaci růstu epitelových buněk (Rubinstein *et al.*, 2013). Buněčné linie s mutací β -kateninu vykazovaly zvýšenou aktivaci β -kateninu a stimulovaly růst CRC buněk

v přítomnosti buď purifikovaného FadA nebo *F. nucleatum* (Kostic *et al.*, 2013; Rubinstein *et al.*, 2013). To nebylo pozorováno v nerakovinných buňkách HEK-293, což naznačuje, že podpora tumorigeneze *F. nucleatum* je následkem mutačních událostí. Tyto výsledky identifikovaly potenciální podíl bakterií rodu *Fusobacterium* na kolorektální karcinogenezi.

1. 3. 5. *Bacteroides fragilis*

Mezi bakterie často asociované s CRC patří také *Bacteroides fragilis*, konkrétně jeho enterotoxigenní kmen (ETBF). Společná kolonizace ETBF a *pks*⁺ *E. coli* má za následek zvýšení zátěže nádoru ve srovnání s monokolonizací, protože ETBF podporuje degradaci mucinu, přičemž upřednostňuje kolonizaci *pks*⁺ *E. coli*, která vede ke genotoxicitě (Dejea *et al.*, 2018). Sears *et al.* (2008) provedli studii spojující průjmové onemocnění způsobené ETBF kmenem s fekálními leukocyty a prozánětlivými cytokiny (IL-8 a TNF- α), což implikovalo tento kmen jako etiologii zánětlivého průjmového onemocnění. Časem může zánět způsobit poškození DNA a vést k rakovině.

1. 4. Cyklomoduliny

Bakterie používají různé molekulární mechanismy, aby se připojily k hostitelským buňkám, vstoupily do nich, pohybovaly a množily se v nich. Mikrobiální patogeny si pro úspěšnější kolonizaci a patogenezí vyvinuly propracované mechanismy pro blokování nebo podvracení normálních hostitelsko-buněčných procesů (Nougayrède *et al.*, 2005). Mnoho patogenních bakterií se zachycuje na hostitelských buňkách a následně je invaduje vstříkáním vlastních proteinů (často napodobujících ligandy eukaryotických buněk) zaměřujících se na cytoskelet a různé signální transdukční dráhy.

Patogeny, které zůstanou ve vakuole po bakteriální invazi, mohou řídit vezikulární transport hostitelských buněk a endocytózu. Jiní získávají přístup k cytoplazmě unikáním ze specifických vezikulárních kompartmentů podél vezikulárních cest. U retrográdních toxinů (cesta od časných endozomů po Golgiho aparát a poté endoplazmatické retikulum), jako jsou Exotoxin A od *Pseudomonas aeruginosa* a Shiga podobné toxiny z patogenní *E. coli* (Spooner *et al.*, 2012), je upřednostňováno rozložení před vychytáváním pomocí systému ERAD a vyžaduje předchozí průchod Golgiho aparátem (Mahtal *et al.*, 2020).

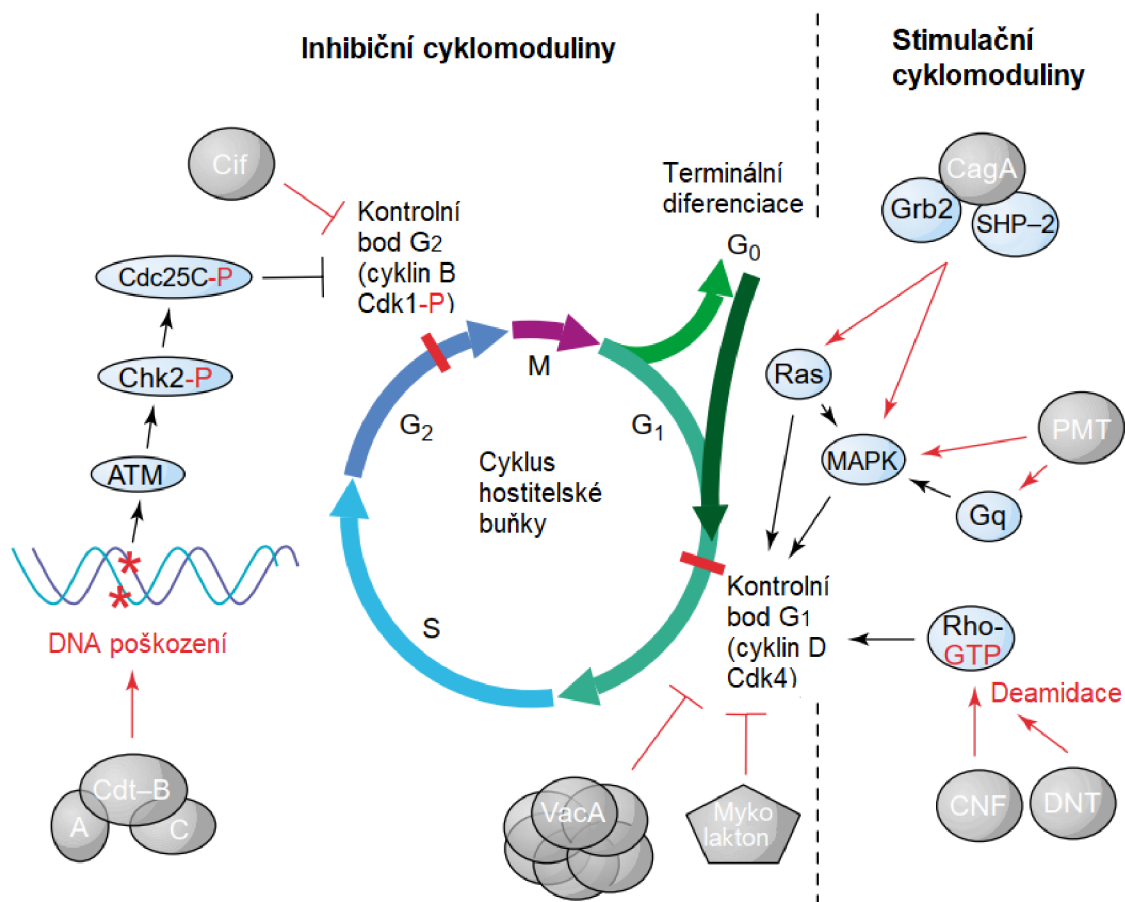
Lumen endoplazmatického retikula je místem vstupu (přes Sec61-asociovaný translokon) vznikajících rozložených proteinů určených pro sekreční cestu nebo pro vložení do

endoplazmatické membrány retikula (Mahtal *et al.*, 2020). Předpokládá se, že řada proteinů používá komponenty ERAD k získání přístupu do cytosolu, ale je odpojena od konečných destruktivních kroků ERAD. Z nich jsou nejlépe charakterizovány katalyticky aktivní řetězce A některých rostlinných a bakteriálních toxinů AB, které vážou komponenty buněčného povrchu a jsou endocytovány, následně transportovány do lumen ER, kde jsou odděleny toxický řetězec A a B vážající se na buňky (Spooner *et al.*, 2006).

Klíčem k odpojení od konečného destruktivního stádia ERAD (alespoň u dvou dislokačních proteinů RTA a CTxA1) je zabránění polyubikvitinace prostřednictvím membránově integrované E3 ligázy Hrd1 (Li *et al.*, 2010). To zase umožňuje obejít interakce Cdc48 / p97 pro cytosolovou extrakci a následnou proteozomální prezentaci (alespoň pro RTA).

Bakterie mají také virulentní mechanismy, které cílí na cyklus hostitelských buněk. Eukaryotický buněčný cyklus – program pro růst a dělení buněk (proliferace) – sestává ze čtyř fází. V G₁ fázi se buňka zvětšuje a zdvojuje organely, v S fázi replikuje DNA a syntetizuje proteiny asociované s DNA, v G₂ fázi syntetizuje proteiny potřebné pro vstup do mitózy a v mitotické fázi dochází k jadernému dělení a následnému dělení cytoplazmy. Na přechodech fází jsou kontrolní body zajišťující „kontrolu kvality“ cyklu.

Cyklus řídí různé elementy, například cyklin-dependentní kinázy, které ve spojení s cykliny zodpovídají za signalizaci od rozhodovacího aparátu buněčného cyklu k efektorům. Cyklin D a Cdk4 kontrolují kontrolní bod G₁, zatímco cyklin B a Cdk1 chrání kontrolní bod G₂. Některé cyklomoduliny podporují buněčnou proliferaci, zatímco inhibiční cyklomoduliny blokují buněčný cyklus (obrázek 4; Oswald *et al.*, 2005). Například *H. pylori* CagA je injikován do hostitelských buněk prostřednictvím T4SS a váže se na Grb2 a SHP-2, což vede k aktivaci dráhy MAPK / Ras, indukuje cyklin D a pohybuje buňku do S fáze. Řízení buněčného dělení je jádrem mnoha biologických procesů a nekontrolovaná buněčná proliferace vede k tumorigenezi.



Obrázek 4: Bakteriální cyclomoduliny a cyklus hostitelské buňky (Oswald *et al.*, 2005)

V tabulce číslo 3 jsou znázorněny některé ze známých cyclomodulinů společně s jejich mechanismy účinku a bakteriemi, které tyto cyclomoduliny tvoří.

Efektor	Bakterie	Mechanismus
Inhibice proliferace		
CDT	<i>Escherichia coli</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Campylobacter sp.</i> , <i>Haemophilus ducreyi</i> , <i>Helicobacter hepaticus</i> , <i>Helicobacter pullorum</i> , <i>Shigella dysenteriae</i>	Fosfodiesterázová aktivita, která vyvolává reakci na poškození DNA, což nakonec vede k zastavení buněčného cyklu v G ₂ -M.
Cif	<i>Escherichia coli</i>	Inhibice mitózy, endoreduplikace, fokální adheze a sestavení stresových vláken.
FIP	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Zastavení buněčného cyklu T-buněk v polovině G ₁ .

Mykolakton	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Zastavení buněčného cyklu v G ₀ -G ₁ .
VacA	<i>Helicobacter pylori</i>	Zastavení cyklu T-buněk v G ₁ -S, inhibice aktivace T-buněk.
Neznámý	<i>Escherichia coli</i>	Zastavení buněčného cyklu v G ₂ -M a zpoždění buněčné smrti.
Podpora proliferace		
CNF	<i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Stimuluje sestavení aktinových stresových vláken a fokálních adhezí deaminací Gln63 Rho a Gln61 Rac a Cdc42, tvoří multinukleované obří buňky, zvyšuje syntézu DNA.
DNT	<i>Bordetella</i> sp.	Stimuluje sestavení aktinových stresových vláken a fokálních adhezí deaminací nebo polyaminací Gln63 z Rho, vytváří multinukleované obří buňky, zvyšuje syntézu DNA.
PMT	<i>Pasteurella multocida</i>	Aktivuje několik buněčných drah pro přenos signálu, tvorbu stresových vláken a fokálních adhezí, silný mitogen v různých typech buněk.
CagA	<i>Helicobacter pylori</i>	Aktivuje Ras-MEK-ERK dráhu, což vede k rozptylu buněk a proliferaci.

Tabulka 3: Bakteriální cyklomoduliny (Nougayrède *et al.*, 2005; upraveno)

Vzhledem k závažným účinkům cyklomodulinů byla snaha spojit jejich výskyt s některými onemocněními a porovnat je s kontrolními skupinami zdravých osob. Příkladem je práce testující střevní cyklomoduliny u zdravých osob v Portoriku – 8 ze 41 izolátů bylo testováno pozitivně na *pks*, avšak pouze 1 izolát kódoval CNF a žádný nekódoval CDT (Gómez-Moreno *et al.*, 2014). Ve střevní sliznici pacientů s rakovinou tlustého střeva byla zjištěna významně vyšší (39,5 %) míra kmenů *E. coli* produkujících CNF-1 než u pacientů s divertikulózou (12,9 %) (Buc *et al.*, 2013).

1. 4. 1. Cytotoxický nekrotizující faktor

Proteinový toxin CNF-1 je produkován patogenními kmeny *E. coli* a příbuzné toxiny byly nalezeny i u *Y. pseudotuberculosis* a *Bordetella pertussis*. *Cnf*⁺ *E. coli* byly izolovány například i z klinicky normálních a klinicky nemocných fretek (Marini *et al.*, 2004). CNF (stejně tak i

DNT) je transglutamináza katalyzující deaminaci nebo polyaminaci na Gln63 Rho a odpovídající Gln zbytky ostatních členů rodiny Rho, Rac a Cdc42 (Nougayrède *et al.*, 2005).

Aktivace Rho GTPáz je v určitých primárních buňkách nebo buněčných liniích intoxikovaných CNF přechodná (Doye *et al.*, 2002). V těchto buňkách korelovala deaktivace Rho GTPáz se zvýšenou náchylností jejich deaminovaných forem k degradaci zprostředkované ubiquitinem / proteazomem. I když je tedy po infekci CNF-1 okamžitým účinkem deaminace Rho proteinů jejich aktivace, dlouhodobým důsledkem a odpovědí buněčného cyklu savců na CNF a DNT je ubiquitinace aktivovaného Rho a proteazomální degradace zprostředkovaná ubiquitinem.

Cdc42 a Rac jsou členy rodiny Rho ovlivňující buněčnou polaritu, adhezi, migraci, proliferaci a vezikulární transport. Cdc42 kontroluje organizaci aktinových vláken a filopodií (malé extenze cytoplazmy). Rac kontroluje tvorbu lamelipodií (rozsáhlé výběžky cytoplazmy, které se tvoří v souvislosti s pohybem buněk). Signální dráhy Rho a Rac proteinů jsou také zodpovědné za regulaci změn aktinového cytoskeletu, čímž ovlivňují dynamiku cytoskeletu.

Epitelové buňky exponované CNF-1 jsou schopny přijímat apoptotické, ale nikoli živé buňky, prostřednictvím fenoménu zvaného makropinocytóza (Fabbri *et al.*, 2002). Toto vychytávací chování může být normálně aktivováno v mukózních epiteliálních buňkách, aby se podpořila nebo integrovala aktivita rezidentních makrofágů během bakteriálního růstu. Existují také důkazy, že CNF projevuje antiapoptický vliv zvýšením exprese proteinů v rodině Bcl-2 (Fiorentini *et al.*, 1998). Rodina Bcl-2 je nejvýznamnější pro svou regulaci apoptózy, formy programované buněčné smrti, na mitochondrii. Zhang *et al.* (2018) pozorovali přežití buněk ošetřených CNF-1 depolyploidizací a tvorbou genomicky nestabilního potomstva. Zvýšená genomická nestabilita v přežívajících dceřiných buňkách může mít za následek to, že CNF-1 hraje potenciální roli v karcinogenezi.

Bakteriální virulenční faktory mohou mít také potenciální úlohu při podpoře epitelální mezenchymální tranzice a následně při podpoře progresu a metastázy nádorů. Práce, kterou zpracoval Fabbri *et al.* (2020) ukazuje, že CNF-1 může urychlit transformaci pouze v již transformovaných buňkách. Zdůrazňuje tak roli cílové buňky a okolního mikroprostředí jako rozhodujících hráčů v bakteriálních infekcích.

CNF-1 je absorbován savčími buňkami endocytózou (Boquet, 2001). Po internalizaci je CNF-1 přemísťován do pozdních endozomů transportem závislým na mikrotubulích. Z pozdních endozomů toxin vstupuje do cytosolu translokací endozomální membránou závislou na kyselém pH (Boquet, 2001; Blumenthal *et al.*, 2007).

Yersinia pseudotuberculosis způsobuje onemocnění spojené s gastrointestinálními těžkostmi, horečkou a průjmem. Tato bakterie produkuje toxin zvaný CNF-Y (Blumenthal *et al.*, 2007). Je známo, že tento toxin interaguje s odlišným receptorem na živočišných buňkách než CNF-1. Virulenční gen *Yersinia pseudotuberculosis cnf-Y* je teplotně regulován skrz „RNA teploměry“ (Twittenhoff *et al.*, 2020). RNA teploměr je teplotně citlivá nekódující molekula RNA regulující genovou expresi. *Cnf-Y* tvoří nový typ struktury, která je tepelně labilní a umožňuje zvýšenou vazbu ribosomů při tělesné teplotě.

Bodové mutace posilující interakci na Shine-Dalgarnově sekvenci brání produkci CNF-Y při 37 °C (Twittenhoff *et al.*, 2020). Kmeny *Y. pseudotuberculosis* nesoucí takové stabilizované varianty RNA teploměrů byly avirulentní v myším modelu, který prokazoval důležitost přesného snímání teploty pro úspěšné interakce hostitel-mikrob. Závěrem je model, ve kterém RNA teploměr funguje jako translační zátaras ve dvouvrstvé regulační kaskádě, která přísně kontroluje poskytování toxinu CNF-Y během akutní infekce.

1. 4. 2. Cytoletální distendující toxin

Brückner *et al.* (2020) zjistili, že se v izolátech *Arcobacter lanthieri* nachází geny *cdtA*, *cdtB* a *cdtC* a jejich přítomnost tak ukazuje na sekreci CDT jako potenciálního mechanismu, který je základem jejich cytotoxicity. *Salmonella typhi*, což je výjimka, nekóduje *cdtA* a *cdtC*, ale dodává enzymatický *cdtB* přímo do hostitelských buněk cestou bakteriální internalizace (Haghjoo *et Galán*, 2004). CdtB je poté přemístěn do jádra retrográdní transportní cestou přes časně a pozdní endozomy (Guerra *et al.*, 2005).

1. 4. 3. Kolibaktin

Tým vedený Jean-Philippe Nougayrèdem (2006) z Insermu, francouzského lékařského výzkumného ústavu, uvedl, že kmeny *E. coli* obsahující určitý genový klastr mohou v savčích buňkách rozbít dvojvláknovou DNA. Ostrov *pks* kóduje enzymy (polyketid-syntázy) nezbytné pro syntézu genotoxinu kolibaktinu, o kterém bylo prokázáno, že v savčích buněčných liniích indukuje DNA dvouřetězcové zlomy (Nougayrède *et al.*, 2006; Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). Ukázalo se, že kolibaktin indukuje poškození DNA dvouřetězcovými zlomy a genomickou nestabilitu *in vitro* i *in vivo* v enterocytech nebo kolonocytech.

Kawanishi *et al.* (2019) zjistili, že kmeny *E. coli* produkující kolibaktin izolované od japonského pacienta s CRC vykazovaly genotoxicitu v testovacích systémech *in vitro*. Jejich data ukazují, že kmeny *E. coli* indukují zlomy DNA přímo nebo nepřímo, což vede k tvorbě mikronuklei v savčích buňkách. *In vitro* jediná krátká infekce různých savčích buněk živými *E.*

coli produkujícími kolibaktin vedla k indukci anafázových můstků, tvorbě mikronukleí a chromozomových aberací (Nougayrède *et al.*, 2006).

Kmeny *E. coli* nesoucí ostrov *pks* byly nalezeny s vyšší frekvencí ve vzorcích sliznice od jedinců trpících CRC a IBD ve srovnání s kontrolní skupinou (Arthur *et al.*, 2012). Data Dalmassa *et al.* (2014) podporují hypotézu, že bakterie produkující kolibaktin mohou hrát v CRC důležitou roli. Vědci tedy chtějí izolovat toxin s nadějí, že ho prostudují a přijdou na jeho roli v rakovině (Arnaud, 2019). Problémem je ovšem komplikovaná izolace. Je možné, že existuje více než jeden toxin – genový klastr kóduje soubor 19 proteinů. Kolibaktiny jsou také nestabilní – jejich izolace a získání strukturálních informací o nich je obtížné.

Objevil se také předpoklad, že kolibaktin dokáže zesíťovat DNA. Genotoxicita kolibaktinu je částečně způsobena adicí nukleotidu na elektrofilní cyklopropan (Healy *et al.*, 2016). Po reakci „prekolibaktinu“ obsahujícího cyklopropan s linearizovanou plazmidovou DNA odhalila gelová elektroforéza malá množství domnělého aduktu s vyšší molekulovou hmotností (Vizcaino *et Crawford*, 2015). Healy *et al.* (2016) za použití strategie syntézy namísto purifikace z bakteriální kultury navrhli 13 syntetických derivátů kolibaktinu a ukázali, že cyklopropan je rozhodující pro účinnou alkylaci DNA kolibaktinem.

Práce *in vitro* za použití syntetických „napodobenin kolibaktinu“, sloučenin navržených na základě částečných biosyntetických informací, ukázala, že cyklopropanový kruh v předpokládaném produktu štěpení kolibaktin peptidázy může být napaden thiolovým nukleofilem a je nezbytný, aby tyto molekuly stříhaly purifikovanou DNA (Healy *et al.*, 2016). Byla provedena studie představující první použití necílených DNA aduktomik pro identifikaci a objasnění neznámých střevních mikrobiálních modifikací DNA, která prokázala, že bakteriální genotoxin kolibaktin ve střevech alkyluje DNA *in vivo* (Wilson *et al.*, 2019).

Studie, kterou provedli Lucas *et al.* (2020), pomáhá lépe porozumět mechanismu, který je základem interakce mezi hostitelem a kmeny CoPEC spojenými s CRC. Byla popsána modifikace exprese proteinů asociovaných s autofagií v CRC, ačkoli výsledky z různých prací nejsou konzistentní. Autofagie je přirozený regulovaný mechanismus buňky, který odstraňuje zbytečné nebo nefunkční komponenty. CoPEC je schopen podporovat tumorigenezi tlustého střeva v modelech myši CRC, například myši ošetřených AOM/DSS (Cougoux *et al.*, 2014). Infekce IEC a vnímavých myši CoPEC podporuje autofagii, která je nutná k zabránění kolorektální tumorigeneze (Lucas *et al.*, 2020). Ztráta ATG16L1 z IEC zvyšuje markery zánětu, poškození DNA a buněčné proliferace a zvyšuje kolorektální tumorigenezi u myši *Apc^{Min/+}*

(myší model pro střevní tumorigenezi) infikovaných 11G5 (kmen CoPEC). Tato zjištění naznačují důležitost autofagie v reakci na infekci CoPEC a pro pacienty s kolonizací CRC a CoPEC by mohly být vyvinuty strategie pro vyvolání autofagie.

Lucas *et al.* (2020) ukázali, že inhibice autofagie v buňkách HCT-116 vede ke zvýšené senescenci vyvolané 11G5, což následně podporuje proliferaci neinfikovaných buněk. Ukázalo se, že vícenásobné poškození DNA indukované CoPEC způsobuje zastavení buněčného cyklu a senescenci infikovaných buněk (Cognoux *et al.*, 2014). Ty poté získávají sekreční fenotyp spojený se senescencí, který je doprovázen sekrecí růstových faktorů, které mohou stimulovat neinfikovanou buněčnou proliferaci. Biologické studie jasně ukázaly, že bakterie produkující kolibaktin mají protizánětlivé účinky (Olier *et al.*, 2012). Přítomnost funkčního ostrova patogenity *pks* je nezbytná pro probiotické vlastnosti kmene *E. coli* Nissle 1917, aby mohl uplatnit své protizánětlivé účinky na myším modelu používaném pro kolitidy.

1. 4. 4. Cyklus inhibující faktor

EPEC je spojována s průjmovými onemocněními u mladých zvířat a dětí a je důležitou příčinou úmrtnosti kojenců v rozvojovém světě (Oswald *et al.*, 2005). Tento humánní a enterický patogen je úzce spjat se zoonotickým patogenem EHEC, který ve vyspělých zemích způsobuje akutní gastroenteritidu, hemoragickou kolitidu a hemolyticko-uremický syndrom. Geny EPEC a EHEC kódující efektorové molekuly Tir, EspF, Map, EspG a EspH, jakož i geny kódující T3SS, jsou umístěny na ostrově patogenity LEE.

Jak EPEC, tak EHEC používají T3SS kódovaný LEE k injekci velkého repertoáru efektorových proteinů a k potlačení buněčných mechanismů, což nakonec vede k tomu, že bakterie jsou těsně připojeny k epiteliálním buňkám (Oswald *et al.*, 2005). Ukázalo se, že jeden substrát EPEC a EHEC T3SS inhibuje progresi buněčného cyklu. Cif byl prvním objeveným efektozem translokovaného T3SS *E. coli* nekódovaným LEE – je kódován lambdoidním profágem přítomným ve většině kmenů EPEC a EHEC (Marchès *et al.*, 2003). Cif je modulární protein složený z vyměnitelného sekrečního a translokačního signálu spojeného s funkční doménou přítomnou v jiných efektorových proteinech z T3SS *Burkholderia pseudomallei* a *Phototorhabdus luminiscens* (Charpentier *et Oswald*, 2004).

Studie, kterou provedl Taieb *et al.* (2006) ukazuje, že cytostatická aktivita Cif je nezávislá na typu buněk, protože transformované (HeLa, Caco-2) a netransformované (IEC-6) buňky vykazovaly inhibici přechodu G₂/M. Některé lidské a zvířecí klinické izoláty EPEC vyvolávají nevratný cytopatický účinek v epiteliálních buňkách. Tento cytostatický účinek není funkčně

spojen s přestavbou cytoskeletu, ale je spojen s udržováním cyklin-dependentní kinázy Cdk1, klíčového efektoru, který řídí vstup do mitózy, v premitotickém tyrosin-fosforylovaném stavu (Nougayrède *et al.*, 2001).

1. 4. 5. Ostatní cyklomoduliny

CD8 T-buňky mohou hrát prozánětlivou a pro-tumorigenní roli v kontextu dysbiotického mikrobiomu a dysbióza může přispívat ke zvýšené náchylnosti k nádoru zvýšením vyčerpání T-buněk (Yu *et al.*, 2020). Shenker *et Datar* (1995) ve své studii prokázali, že purifikovaný FIP byl schopen inhibovat mitogenem indukovanou proliferaci lidských T-buněk (v závislosti na dávce). Dále prokázali, že FIP zastavuje lidské T-buňky ve fázi G1 buněčného cyklu.

M. ulcerans je pomalu rostoucí mykobakterium, které klasicky infikuje kůži a podkožní tkáň a způsobuje neulcerované a ulcerované léze. Onemocnění pojmenované Buruliho vřed je charakterizováno přetrvávajícími závažnými nekrotickými lézemi kůže a podkladového tuku a nedostatkem akutní zánětlivé odpovědi. *M. ulcerans* sekretuje makrolid odvozený od polyketidu, mykolakton, který při intradermální injekci morčat dokázal reprodukovat většinu patologie (George *et al.*, 1999). Polyketid syntázy jsou velké multienzymové komplexy s koordinovaným sdružením aktivních míst. Mykolakton z *M. ulcerans* indukuje zastavení buněčného cyklu v kultivovaných lymfocytech, následuje smrt lymfocytů apoptózou (Pahlevan *et al.*, 1999). Imunosupresivní aktivita mykolaktonu není omezena na cyklus buněk, protože toxin je také schopen inhibovat produkci cytokinů a funkci NF- κ B v lidských monocytech.

H. pylori je původcem žaludečních chorob, jako jsou peptidické vředy a chronická gastritida, a je považován za rizikový faktor při rakovině žaludku. Tato onemocnění jsou zprostředkována faktory virulence včetně vakuolačního cytotoxinu (VacA) (Oswald *et al.*, 2005). VacA je exprimován jako prekurzorový protein 140 kDa a aktivně se vylučuje mechanismem autotransportéru typu V. Extracelulární 95 kDa VacA tvoří ve styku s hostitelskou buňkou anion-selektivní póry oligomerací membránově vázaných monomerů a je internalizována endocytózou. Aktivita VacA je spojena s rychlou tvorbou kyselých vakuol obohacených o pozdní endozomální a lysozomální markery (De Luca *et Iaquinto*, 2004). Chronická infekce způsobená *H. pylori* je spojena s žaludečními vředy a vývojem karcinomu žaludku a bylo prokázáno, že produkce CagA je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje adenokarcinomu žaludku.

P. multocida způsobuje řadu nemocí u volně žijících a domácích zvířat i lidí. PMT vede k celé řadě buněčných efektů, které jsou zprostředkovány pouze částečně heterotrimerním G-

proteinem G_q (Zywietz *et al.*, 2001). Tvorba inositol fosfátů v reakci na PMT je závislá na G_{α_q} , ale ne na úzce souvisejícím $G_{\alpha_{11}}$. Receptory napojené na protein G řídí aktivitu enzymů nebo průchodnost kanálků prostřednictvím proteinu G. Nejčastějšími cílovými enzymy jsou adenylátcykláza (tvorba cAMP) a fosfolipáza C (tvorba inositoltrifosfátu a diacylglycerolu). Nezávisle na G_q / G_{11} může PMT indukovat také aktivaci MAP kináz (Zywietz *et al.*, 2001).

Určité cyklomoduliny (jako CDT a Cif) by také mohly narušit integritu střevní bariéry a umožnit vstup patogenních bakterií do těla nebo by mohly prodloužit lokální existenci patogenních bakterií blokováním odlupování epitelu (Marchès *et al.*, 2003).

1. 5. Koliciny

Bakteriociny jsou látky ribosomálně syntetizované bakteriemi. Jsou to proteinové nebo peptidické toxiny inhibující růst podobných nebo blízce příbuzných bakteriálních kmenů. Bakteriociny jsou heterogenní skupinou a Cotter *et al.* (2005) navrhli jejich rozdělení do následujících čtyř tříd. Třída I zahrnuje peptidy v rozmezí od 19 do 38 aminokyselin charakterizovaných posttranslačně modifikovanými aminokyselinami. Třída II zahrnuje malé (<10 kDa) nonlanthionin obsahující peptidy. Podskupina zahrnuje bakteriociny podobné pediocinům, které obsahují motiv YGNGVXCXXXXVXV zvláště aktivní proti *Listeria monocytogenes* (třída IIa), nespecifikovaným bakteriocinům (třída IIb) a vícesložkovým bakteriocinům (třída IIc). Větší bakteriociny jsou rozděleny mezi třídy IIIa (bakteriolytické) a IIIb (nelytické). Nakonec bakteriociny třídy IV lze rozlišit podle jejich cyklických struktur.

Kolicin je typ bakteriocinu toxický většinou pro některé kmeny *E. coli*, mikrocin je velmi malý bakteriocin složený z relativně malého počtu aminokyselin. Jak koliciny, tak mikrocin jsou schopné zabíjet úzké spektrum konkurenčních bakterií *E. coli* a dalších fylogeneticky příbuzných bakterií (Cascales *et al.*, 2007). Cytotoxické mechanismy kolicinů a mikrocinů mohou být různé – mohou tvořit póry nebo působit enzymaticky. Enzymatické koliciny mohou narušovat syntézu peptidoglykanů nebo fungovat jako nukleázy. Tato rozmanitá skupina enzymů se zaměřuje na genomovou DNA (DNázy), 16S rRNA (rRNázy) nebo tRNA (tRNázy). Koliciny obsahují funkčně odlišné modulární domény, a to translokační doménu, doménu vázající receptor a toxickou doménu.

Kmeny izolované ze sliznice tlustého střeva u pacientů s kolorektální neoplazií produkují koliciny a mikrocinu častěji ve srovnání s kontrolami (Kohoutová *et al.*, 2020). Sliznice

tlustého střeva u pacientů s pokročilejší kolorektální neoplázií je kolonizována virulentnějšími kmeny *Escherichia coli* a u těchto pacientů je pozorována vyšší produkce bakteriocinu ve srovnání s pacienty s méně pokročilými kolorektálními neoplaziemi (Kohoutová *et al.*, 2014). Kohoutová *et al.* předpokládají, že „intermikrobiální soutěž“ (o výživu a další) ve velkém střevě zdravých jedinců může být zprostředkována současnou produkcí mikrocinů a kolicinů.

1. 5. 1. Kolicin E1

Kolicin E1 patří mezi koliciny tvořící kanály. Data v práci Su *et al.* (2019) poskytují pohled na napěťově řízený mechanismus iontových kanálů kolicinu E1 ve fosfolipidových dvojvrstvách s využitím plovoucí dvojvrstvé lipidové membrány na povrchu kovové elektrody (simulující tak kvazi-přírodní prostředí). V této práci byl kolicin E1 zaveden do plovoucí dvojvrstvy 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-fosfocholinu. Snížení úhlu náklonu α -helixů a současné snížení membránového odporu naznačuje, že jsou helixy vloženy do membrány a tvoří v ní iontové kanály.

Zvýšená frekvence genů kódujících kolicin E1 byla popsána u uropatogenních kmenů *E. coli* (Šmajš *et al.*, 2010) a kolicin E1 je také jeden z nejčastěji detekovaných kolicinů u CRC pacientů (Kohoutová *et al.*, 2020). Tento kolicin působí nejen na bakteriální, ale i na eukaryotické buňky a jeho účinek byl pozorovaný na HeLa buněčných liniích a myších fibroblastech (Šmarda, 1978; Chumchalová *et Šmarda*, 2003).

Gen kódující kolicin E1 může mít více genetických variant (Riley *et al.*, 1994). Riley *et al.* (1994), Šmajš *et al.* (2002) a Micenková (2016) popsali dvě hlavní skupiny kolicin E1 genetických klastrů, ale jejich biologický význam je momentálně nevyjasněný. Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma variantami byl nalezený v oblasti kódující receptor vazebnou doménu, která je zodpovědná za vazbu na hostitelské buňky (Micenková, 2016). V kmenech izolovaných v České republice byly popsány dvě často se vyskytující varianty tohoto genu – jedna typická pro intestinální kmeny *E. coli* a druhá pro extraintestinální kmeny *E. coli* (Micenková, 2016).

2. Cíle

Cílem této práce bylo shrnout poznatky o cyklomodulech a zjistit, zda existují souvislosti s výskytem cyklomodulinů u pacientů s kolorektálním karcinomem. K tomuto účelu byly použity již dříve odebrané vzorky stolice, tumoru a stěru ze zdravé tkáně od pacientů s kolorektálním karcinomem a jako kontrola nasbírány vzorky stolice od zdravých jedinců. Zároveň bylo cílem optimalizovat qPCR a její následné použití ke studiu cyklomodulinů ve vzorcích stolice od zdravých jedinců a pacientů.

3. Vymezení autorských podílů

Odběry tumorů a stěrů ze zdravých tkání byly prováděny personálem Masarykova onkologického ústavu. Na tomto pracovišti zároveň také probíhala izolace DNA ze všech tří typů vzorků od pacientů a kontrola její kvality.

Náplní mé práce byla izolace DNA od zdravých jedinců a následná amplifikace genu pro 16S rRNA, kontrola kvality DNA, přečištění amplikonů, kontrola kvality a kvantity přečištěných PCR produktů a poolování vzorků. Na stejných krocích se u všech použitých vzorků od pacientů kromě mě podílely i Mgr. Lenka Micenková, Ph.D. a Mgr. Martina Hrivňáková. Další kroky (indexační PCR, přečištění amplikonů po indexaci a sekvenování) prováděla Mgr. Lenka Micenková, Ph.D. Bioinformatické zpracování dat ze sekvenací měl na starost Ing. Stanislav Smatana.

Při klonování jsem spolupracovala s Mgr. Lenkou Micenkovou, Ph.D. Ona měla na starost výběr vhodného klonovacího vektoru, úpravu konců vektorů a konců klonované DNA tak, aby konce byly vzájemně kompatibilní, vložení vektoru s inzertem do hostitelských bakteriálních buněk a namnožení hostitelských buněk. Já jsem pracovala na vložení DNA do vektoru a izolaci plazmidové DNA s inzertem. Následné ředění kalibrační řady a měření pomocí qPCR jsem zpracovávala já.

4. Materiál a metody

Vzorky od pacientů (stěry ze zdravé tkáně a přímo z nádoru) byly odebírány na Masarykově onkologickém ústavu, vzorky stolice si každý účastník odebral sám. Všem vzorkům bylo po odběru přiřazeno identifikační číslo, pod kterým bylo vedeno v databázi.

Vzorky od pacientů byly vybrány ze studie zabývající se střevním mikrobiomem ve vztahu k heterogenitě kolorektálního karcinomu, konkrétně byly použity ty, které měly dostatečnou koncentraci a byly k dispozici analýzy ze všech tří typů vzorku (stolice, stěr ze zdravé tkáně a přímo z nádoru). Pro kontrolní skupinu byly vybírány vzorky od jedinců bez diagnózy CRC (primárně s vyšším věkem, protože CRC se vyskytuje právě ve vyšším věku). Součástí odběrů vzorků bylo podepsání informovaného souhlasu a vyplnění dotazníku (obojí schválené etickou komisí). Dotazník obsahoval dotazy na základní osobní a profesní údaje, socioekonomickou a zdravotní situaci. Bohužel jsem nedostala k dispozici výsledky dotazníků od pacientů a čtyři osoby z kontrolní skupiny nevyplnily dotazník.

Vzorky od pacientů byly odebírány v letech 2016-2018, od zdravých jedinců v letech 2018 a 2019. Celkem se této studii zúčastnilo 105 pacientů a 148 zdravých jedinců. Znamé věkové rozpětí zdravých jedinců bylo od 2 do 91 let s mediánem 49 let (tabulka 4). Věkové rozpětí pacientů bylo od 31 do 85 let s mediánem 69 let.

Dohromady tedy bylo ke studii použito od pacientů 105 stolic, 105 stěrů ze zdravé tkáně a 105 nádorů, od zdravých jedinců 148 stolic. Vzorky stolic byly odebrány pomocí transportních tampónů (Deltalab). Tampóny byly nastříhány do zkumavky a uloženy do -80 °C. Po odebrání vzorků z resekátu byly tyto vzorky následně uloženy na dobu maximálně dvou týdnů v mrazáku při teplotě skladování -20 °C.

ID vzorku	Pohlaví	Věk	Váha	Apendektomie	ID vzorku	Pohlaví	Věk	Váha	Apendektomie
C1	Žena	31	69	Ne	C75	Žena	22	77	Ne
C2	Žena	54	59	Ne	C76	Muž	75	90	Ne
C3	Muž	31	101	Ne	C77	Muž	49	99	Ne
C4	Žena	27	67	Ne	C78	Muž	51	85	Ne
C5	Žena	41	80	Ano	C79	Žena	23	58	Ne
C6	Žena	53	64	Ne	C80	Žena	61	60	Ne

C7	Žena	58	72	Ne	C81	Muž	54	80	Ano
C8	Žena	40	76	Ne	C82	Žena	52	62	Ne
C9	Žena	45	58	Ne	C83	Žena	60	63	Ne
C10	Žena	58	80	Ne	C84	Žena	43	65	Ne
C11	Žena	66	68	Ne	C85	Žena	41	85	Ne
C12	Muž	68	100	Ne	C86	Muž	70	90	Ne
C13	Muž	37	70	Ne	C87	Muž	42	92	Ne
C14	Žena	35	80	Ne	C88	Žena	7	17	Ne
C15	Žena	77	116	Ano	C89	Žena	11	36	Ne
C16	Žena	28	60	Ne	C90	Žena	57	75	Ano
C17	Žena	54	62	Ne	C91	Žena	60	69	Ne
C18	Muž	30	74	Ne	C92	Muž	63	86	Ne
C19	Žena	55	85	Ne	C93	Muž	47	92	Ne
C20	Muž	33	77	Ne	C94	Muž	14	61	Ne
C21	Žena	55	85	Ne	C95	Muž	42	65	Ne
C22	Žena	60	75	Ano	C96	Muž	60	73	Ne
C23	Žena	49	63	Ano	C97	Žena	28	68	Ne
C24	Žena	35	56	Ne	C98	Žena	51	67	Ne
C25	Muž	31	88	Ne	C99	Žena	50	65	Ano
C26	Žena	33	51	Ne	C100	Muž	24	90	Ne
C27	Muž	64	94	Ne	C101	Muž	39	85	Ne
C28	Muž	30	95	Ano	C102	Muž	66	77	Ne
C29	Žena	29	83	Ne	C103	Muž	48	92	Ne
C30	Muž	61	107	Ne	C104	Žena	50	75	Ano
C31	Muž	38	80	Ne	C105	Žena	53	89	Ne

C32	Žena	35	60	Ne	C106	Žena	42	59	Ano
C33	Žena	56	72	Ne	C107	Žena	67	59	Ne
C34	Muž	20	78	Ne	C108	Muž	69	76	Ne
C35	Muž	39	82	Ne	C109	Muž	23	70	Ne
C36	Žena	20	57	Ne	C110	Žena	44	50	Ano
C37	Muž	38	75	Ne	C111	Žena	56	65	Ne
C38	Žena	40	67	Ne	C112	Žena	24	45	Ne
C39	Žena	66	65	Ne	C113	Muž	58	85	Ano
C40	Žena	40	75	Ne	C114	Žena	51	61	Ne
C41	Žena	52	61	Ne	C115	Žena	61	95	Ne
C42	Žena	41	60	Ne	C116	Muž	57	92	Ne
C43	Muž	-	-	-	C117	Muž	55	86	Ne
C44	Žena	-	-	-	C118	Žena	61	74	Ne
C45	Žena	41	55	Ne	C119	Žena	55	114	Ano
C46	Žena	51	61	Ano	C120	Muž	60	100	Ne
C47	Žena	68	92	Ano	C121	Žena	26	62	Ne
C48	Muž	41	80	Ne	C122	Žena	27	64	Ne
C49	Žena	26	62	Ne	C123	Muž	32	70	Ano
C50	Žena	52	53	Ne	C124	Muž	36	77	Ne
C51	Žena	76	103	Ne	C125	Žena	24	78	Ne
C52	Žena	53	82	Ne	C126	Žena	24	62	Ne
C53	Muž	69	85	Ne	C127	Muž	28	78	Ne
C54	Žena	40	95	Ne	C128	Žena	26	61	Ano
C55	Žena	52	71	Ne	C129	Žena	39	73	Ne
C56	Žena	28	59	Ne	C130	Žena	22	70	Ne

C57	Muž	58	82	Ne	C131	Muž	-	-	-
C58	Žena	54	50	Ne	C132	Žena	91	71	Ne
C59	Žena	48	65	Ne	C133	Žena	50	90	Ne
C60	Muž	51	78	Ano	C134	Žena	58	103	Ne
C61	Muž	60	67	Ne	C135	Žena	68	80	Ne
C62	Muž	53	76	Ne	C136	Muž	71	98	Ne
C63	Muž	32	95	Ne	C137	Žena	33	68	Ne
C64	Muž	36	105	Ne	C138	Muž	63	83	Ne
C65	Muž	46	105	Ne	C139	Muž	51	132	-
C66	Žena	45	65	Ano	C140	Žena	33	69	Ne
C67	Muž	64	80	Ne	C141	Žena	4	16	Ne
C68	Muž	44	64	Ne	C142	Žena	32	72	Ne
C69	Muž	2	13	-	C143	Žena	86	60	Ne
C70	Žena	34	55	Ne	C144	Žena	51	99	-
C71	Muž	54	83	Ne	C145	Muž	52	110	Ne
C72	Muž	52	114	Ne	C146	Muž	39	88	Ne
C73	Žena	50	80	Ano	C147	Žena	22	66	Ne
C74	Žena	72	65	-	C148	Žena	-	-	-

Tabulka 4: Vybrané informace týkající se vzorků kontrolní skupiny

4. 1. Protokol přípravy knihovny a sekvenace genu pro 16S rRNA

4. 1. 1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA byl použit izolační kit DNeasy PowerSoil Kit (100). Izolace byla prováděna ručně, postupováno bylo dle upraveného protokolu pro MOBIO PowerSoil DNA Isolation Kit (Příloha 1).

4. 1. 2. Měření koncentrace genomické DNA

Po izolaci gDNA byla měřena její koncentrace a čistota pomocí přístrojů NanoDrop ND 2000 (Thermo) a Synergy HTX (BioTek). Pro měření na přístroji NanoDrop™ byl použit 1 µl gDNA, pro Synergy HTX byly použity 2 µl gDNA.

Po izolaci byla také gDNA kontrolována provedením agarózové gelové elektroforézy (1%) s přidáním GelRed® (Biotium) (Příloha 2). Pro kontrolu velikosti byl použit 1 kb standard.

4. 1. 3. Amplifikace genu pro 16S rRNA

K amplifikaci genu pro 16S rRNA ze všech tří typu vzorků od pacientů byla použita polymeráza HotStart *Taq* DNA Polymerase (NEB). K amplifikaci ze stolic od kontrolní skupiny byla vybrána polymeráza Q5 HighFidelity 2x MM (BioLabs), protože se ukázala jako účinnější.

K PCR byl využíván přístroj Mastercycler Gradient GSX1 Thermal Cycler (Eppendorf) a postupováno bylo dle standardního operačního postupu používaného v laboratoři, kde jsem pracovala na své diplomové práci (Příloha 3). Reakční složky jsou uvedeny v tabulce 5 a programy reakcí jsou v tabulce 6. Některé vzorky s velkou koncentrací nebo obsahující inhibitory reakce byly před samotnou reakcí naředěny.

Složky reakce	Objem složky reakce (µl)	
	HotStart	Q5
MasterMix	15	15
F primer	0,9	1
R primer	0,9	1
H ₂ O	10,2	10
DNA	3	3

Tabulka 5: Složky PCR u použitých polymeráz

Krok	Parametry jednotlivých kroků		Počet cyklů
	HotStart	Q5	
Počáteční denaturace	15 min 95 °C	30 s 98 °C	1

Denaturace	35 s	10 s	
	94 °C	98 °C	
Nasedání primerů	35 s	15 s	30
	55 °C	55 °C	
Extenze	45 s	30 s	
	72 °C	72 °C	
Závěrečná extenze	10 min	2 min	1
	72 °C	72 °C	

Tabulka 6: Programy PCR u použitých polymeráz

K amplifikaci byla použita sada primerů 16S EMP pro amplifikaci genu pro 16S rRNA. Tyto primery obsahují několik částí – overhang (oblast pro nasednutí indexů), značka (sekvence odlišující mezi sebou jednotlivé vzorky), spacer (oddělení značky a vlastního primeru) a vlastní primer (komplementární k oblasti zájmu).

Přední primery (označované také jako Forward) obsahují overhang v podobě: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG a vlastní primer v podobě: GTGYCAGCMGCCGCGGTAA. V tabulce 7 jsou uvedeny sekvence jednotlivých primerů.

Název	Overhang + značka + spacer + vlastní primer	Délka (bp)
16S_EMP-F_1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCTTCGTCGCGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCATACCGGAAGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCCTGCTACAGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAGACCCTACAGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTTGGTGTAAGGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTACGTATCATGTG TGYCAGCMGCCGCGGTAA	66

16S_EMP-F_7	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCACGCAGTCTACGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_8	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGCACGCCATGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_9	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCGGACAAGAAGGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_10	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGCTGGACGCTGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_11	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTACTAACGCGGTGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_12	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCGATCACACCTGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_13	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAAACGCACTAAGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_14	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAAGAGGGTTGAGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66
16S_EMP-F_15	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAGTGGTCTGTGT GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	66

Tabulka 7: Přední primery 16S EMP

Zadní primery (označované také jako Reverse) obsahují overhang v podobě: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG a vlastní primer v podobě: GGACTACNVGGGTWTCTAAT. V tabulce 8 jsou uvedeny sekvence jednotlivých primerů.

Název	Overhang + značka + spacer + vlastní primer	Délka (bp)
16S_EMP-R_1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTAACGGTCCACC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGCGCCTTAAACCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTATGGTACCCAGCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68

16S_EMP-R_4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTCTACGTCGCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_5	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTACTGAGGATCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATTCACCTCCTCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_7	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTATAAATGCGCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_8	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCTGCAACACCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_9	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTCGCTCGCTGCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_10	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTCCTTAGTAGTCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_11	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTCCGTATGAACC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_12	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACGTGAGGAACGCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_13	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTTGCCCTGTACC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_14	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATATAGCCCGACC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68
16S_EMP-R_15	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTATGAGATCCC GGACTACNVGGGTWTCTAAT	68

Tabulka 8: Zadní primery 16S EMP

4. 1. 4. Kontrola kvality DNA po amplifikaci

PCR produkty po amplifikaci genu pro 16S rRNA byly naneseny na agarózový gel (1,5%) dle standardního operačního postupu (Příloha 2).

4. 1. 5. Přečištění amplikonů

PCR produkty po amplifikaci genu bylo nutné přečistit od polymerázy, nezačleněných nukleotidů a zbylých primerů. Vzorky byly přečišťovány s využitím roztoku obsahujícího

magnetické kuličky – AMPure XP (Agencourt) dle standardního operačního postupu (Příloha 4).

4. 1. 6. Fluorimetrické stanovení koncentrace

Koncentrace přečištěných amplikonů byla měřená pomocí Quant-iT kitů (Invitrogen). Byl připraven pracovní roztok z Quan-iT reagentu a Quan-iT bufferu v poměru 1:199. Pro vytvoření kalibrační řady bylo do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 190 μ l připraveného pracovního roztoku a 10 μ l standardu. Pro vzorky DNA bylo do jamek mikrotitrační destičky pipetováno 198 μ l pracovního roztoku a 2 μ l vzorku amplikonů. Celkový objem tedy ve všech jamkách činil 200 μ l. Celá směs byla důkladně promíchána, byly vytvořeny duplikáty a následně byla měřena koncentrace přístrojem Synergy HTX (BioTek).

4. 1. 7. Rozdělení vzorků do poolů před indexací

Amplikony byly po přečištění rozděleny a naředěny do poolů na základě fluorimetricky naměřené koncentrace tak, aby byly v jednom poolu vzorky se stejnou koncentrací. Jeden pool obsahoval 15 vzorků.

4. 1. 8. Indexační PCR

Se vzorky rozdělenými do poolů byla provedena indexační PCR, při které byly ke vzorkům připojeny vnější značky (angl. barcode). Tato reakce oproti první probíhala s nižším počtem cyklů, pracovní postup je uveden v příloze 5.

4. 1. 9. Přečištění produktů po indexační PCR a měření koncentrace

Po indexační PCR následovalo přečištění produktů reakce s využitím magnetických kuliček AMPure beads. Postup byl upravený pro použití 50 μ l amplikonu (Příloha 6).

Měření koncentrace proběhlo pomocí Synergy HTX (BioTek) a délka fragmentů byla vypočtena elektroforetickým přístrojem 2200 TapeStation Instrument (Agilent). Před měřením délky fragmentů byly pooly naředěny na 1,5 ng/ μ l, smíchaly se 3 μ l pufru z kitu s 1 μ l DNA, připravil se marker (3 μ l pufru s 1 μ l žebříčkem), vše se 1 minutu vortexovalo, stočilo a použil se fragmentátor. Dále byla pomocí qPCR stanovena koncentrace, pro měření byl použit KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) a přístroj TOptical thermocycler (Biometra). Následně byl na základě naměřené koncentrace z knihovny vytvořen pool. Poté byla znova ověřena délka fragmentů a určena koncentrace knihovny (stejně jako uvedeno výše).

4. 1. 10. Sekvenace DNA

Připravená knihovna byla naředěna na výslednou koncentraci 4 nM a sekvenována za využití sekvenačních kitů MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) (Illumina) a PhiX Control Kit v3 (Illumina). Sekvenace probíhala na přístroji MiSeq (Illumina).

4. 1. 11. Bioinformatické zpracování dat

Vzorky z tohoto projektu byly sekvenovány na sekvenační platformě Illumina MiSeq NGS a výsledné hodnoty byly zpracovány následujícím postupem. Prvním krokem tohoto postupu bylo demultiplexování čtení v sekvenačních poolech do jednotlivých vzorků. Toto bylo provedeno interním nástrojem napsaným v Pythonu 3. Proces demultiplexování byl prováděn současně pro obě čtení v každé dvojici. Pokud některá z čtení v páru měla neočekávanou nebo vůbec žádnou sekvenci značek, celý pár byl vyřazen.

Dalším krokem v postupu bylo oříznutí nekvalitního konce každého čtení. Stanovení délky oříznutí bylo v každém běhu provedeno podle stejného pravidla. Výsledkem bylo, že z každého čtení byl oříznut stejný počet posledních párů bází. S ohledem na očekávanou délku čtení L a délku ořezávání N byla prahová hodnota vždy vypočtena jako $T = L - N$. Stejně jako v případě ořezové délky byl prahový délkový rozdíl vypočítáván pro přední a zpětné čtení zvlášť.

Aby bylo možné spojení, čtení v páru muselo mít překrytí nejméně 20 bp bez jakýchkoli neshod. Jako poslední krok byly odstraněny ze spojených čtení chimérické sekvence pomocí funkce `removeBimera` balíčku DADA2 R. Taxonomie byla stanovena pomocí algoritmu `usearch-konsensus` z nástroje mikrobiomové analýzy QIIME (v 1.9.1.).

4. 2. Klonování

Pro získání kalibračních křivek jednotlivých genů pro qPCR byla použita metoda neenzymatické *in vivo* rekombinantní klonovací strategie. Lokusy jednotlivých genů (*E1*, *E1**, *cnf-1*, *cdt* a *pks*) byly klonovány do vektoru pBAD-HisB (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Je to expresní vektor odvozený od pBR322 používaný v *E. coli*. V přítomnosti L-arabinózy je aktivována exprese z P_{BAD}, zatímco nepřítomnost L-arabinózy vede k velmi nízkým hladinám transkripce z P_{BAD}. Gen rezistence na ampicilin (β -laktamáza) umožňuje selekci plazmidu v *E. coli*.

4. 2. 1. PCR

Lokusy testovaných genů byly nejdříve amplifikovány z kontrolních kmenů (*E. coli* B1876 – E1; *E. coli* B1012 – E1*; *E. coli* BIBD14 – *cnf-1*; *E. albertii* CCM7160 – *cdt* a *E. coli* BIBD3 – *pks*) pomocí colony PCR (PCR z jedné bakteriální kolonie). Reakční směs byla připravována v objemu 30 μl, použita byla polymeráza Q5 HighFidelity 2x MM (BioLabs), složení reakce stejné jako v kapitole 4. 1. 3.

Pro optimalizaci bylo vyzkoušeno různé rozmezí teplot pro nasedání jednotlivých primerů tak, aby nevznikaly nespecifické produkty (ověřováno na 1,5% agarózovém gelu, Příloha 2). Výsledné zvolené podmínky reakce jsou uvedeny v tabulce 9.

Krok	Parametry jednotlivých kroků				Počet cyklů
	<i>E1, E1*</i>	<i>cnf-1</i>	<i>cdt</i>	<i>pks</i>	
Počáteční denaturace	30 s	30 s	30 s	30 s	1
	98 °C	98 °C	98 °C	98 °C	
Denaturace	10 s	10 s	10 s	10 s	30
	98 °C	98 °C	98 °C	98 °C	
Nasedání primerů	30 s	30 s	30 s	30 s	30
	52 °C	56 °C	53 °C	60 °C	
Extenze	30 s	30 s	30 s	30 s	30
	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C	
Závěrečná extenze	2 min	2 min	2 min	2 min	1
	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C	

Tabulka 9: Programy PCR u použitých genů

Sekvence primerů byly získány z článků jiných autorů, pouze *cdtBvar2* byl navržen podle GenBank (AB647636.1). K sekvenci primerů bylo přidáno místo (přesah 18 nukleotidů) specifické pro restriční endonukleázu *PvuII* (v sekvenci podtržená část, Tabulka 10). U variant *cdtClon* a *pksClon* se optimalizace nepodařila, proto byly použité nové primery (*cdtBvar2clon* a *PKSvar2clon*), které se již amplifikovaly bez problémů.

Název	Sekvence primeru	Délka (bp)
E1Clon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCACGTACGCCTTCAGCAACA</u>	310
E1Clon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGCCATCCATTTTCACCACTTC</u>	
E1*Clon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCATCCGGAGGTTATTGACCTGG</u>	305
E1*Clon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGTCATCCACTTTTCGCCAGC</u>	
cnf-1Clon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGAGCGTGCAATCTATCCGTATTT</u>	173
cnf-1Clon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGTGAATTTCCCAGTATAGGTG</u>	
cdtClon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGAGATATCTTAATGATACAAGAAGCA</u>	196
cdtClon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGTGAAACTATAGCTAAATTTACACG</u>	
cdtBvar2clon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCCAGGAATTCCTGTCCGAGA</u>	194
cdtBvar2clon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGCGTATGCCAAGCAATGGTCG</u>	
pksClon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGTCGATATAGTCACGCCACCA</u>	733
pksClon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGGTCAAGCGAGCATACGAACA</u>	
PKSvar2clon-F	<u>AGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGGCGCATCCTCAAGAGTAAATA</u>	283
PKSvar2clon-R	<u>CTTCGAATTCCCATATGGTACCAGGCGCTCTATGCTCATCAACC</u>	

Tabulka 10: Primery pro použité cyklomoduliny a koliciny

PCR produkty byly přečištěny pomocí komerčního kitu QIAquick[®] PCR Purification Kit (postupovalo se podle příslušného manuálu, Příloha 7) a jejich koncentrace následně změřena spektrofotometricky s využitím přístroje Synergy HTX (BioTek).

4. 2. 2. Štěpení plazmidového vektoru

Vektor pBAD-HisB byl štěpen restriční enzymem *PvuII* (New England Biolabs, Ipswich, MA) a purifikován pomocí QIAquick PCR Purification Kit. Po restričním štěpení byl linearizovaný vektor pipetován do 2% agarózového gelu. Pás obsahující plazmid byl vyříznut skalpelem a DNA z pásu byla extrahována dle návodu komerční soupravou QIAquick Gel Extraction Kit.

4. 2. 3. Ligace genu do vektoru

Ligace zahrnovala přípravu ligační směsi obsahující 20 ng vektoru a 100 ng inzertu. Klonování genů bylo provedeno metodou ligace T4 DNA (New England Biolabs, Ipswich, MA).

4. 2. 4. Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA

Po ligaci inzertu do příslušného vektoru byly ligační směsi transformovány do *E. coli*. Chemicky kompetentní buňky *E. coli*[®] 10G pro *in vivo* rekombinantní klonování jsou deriváty *E. coli*, které byly optimalizovány pro transformaci tepelným šokem s vysokou účinností. Tyto buňky byly transformovány štěpeným vektorem a přečištěným PCR produktem s 18 nt přesahy podle protokolu výrobce (Lucigen, Middleton, WI). Transformační protokol je uveden v příloze 8. Poté proběhla selekce na agarových miskách obsahujících 50-100 µg/ml ampicilinu. Z narostlých kolonií bylo vybráno 10 klonů a byla analyzována přítomnost a orientace použitých inzertů pomocí PCR za použití stejných podmínek jako v případě amplifikací genů.

4. 2. 5. Izolace plazmidové DNA *E. coli*

Pro izolaci plazmidové DNA byl použit komerční kit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (250), postupováno bylo podle manuálu dodaného výrobcem (Příloha 9).

4. 3. Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR umožňuje s využitím fluorescence v reálném čase kvantifikovat amplifikaci sledovaného úseku. Studie byla prováděna metodami absolutní i relativní kvantifikace.

4. 3. 1. Příprava standardů pro absolutní kvantifikaci

Z izolované plazmidové DNA byla s pomocí přístroje Synergy HTX (BioTek) naměřena koncentrace. Z naměřených koncentrací byly následně přepočteny nanogramy na kopie jednotlivých genů (tabulka 11) a koncentrace plazmidové DNA potřebné k dosažení požadovaných kopií (tabulka 12). Z každé plazmidové DNA byla připravená ředící řada od 1 300 000 do 130 kopií/µl.

Gen	Počet kopií
<i>E1</i>	2,606×10 ¹⁰
<i>E1*</i>	3,073×10 ¹⁰

<i>cnf-1</i>	5,868 x 10 ⁹
<i>cdt</i>	6,474 x 10 ⁹
<i>pks</i>	6,164 x 10 ⁹

Tabulka 11: Získané počty kopií z klonování do vektoru pro jednotlivé geny

Konečná koncentrace plazmidové DNA (g/μl)					
Počet kopií	<i>E1</i>	<i>E1*</i>	<i>cnf-1</i>	<i>cdt</i>	<i>pks</i>
1 300 000	6,27 x 10 ⁻¹²	6,26 x 10 ⁻¹²	6,08 x 10 ⁻¹²	6,11 x 10 ⁻¹²	6,23 x 10 ⁻¹²
130 000	6,27 x 10 ⁻¹³	6,26 x 10 ⁻¹³	6,08 x 10 ⁻¹³	6,11 x 10 ⁻¹³	6,23 x 10 ⁻¹³
13 000	6,27 x 10 ⁻¹⁴	6,26 x 10 ⁻¹⁴	6,08 x 10 ⁻¹⁴	6,11 x 10 ⁻¹⁴	6,23 x 10 ⁻¹⁴
1 300	6,27 x 10 ⁻¹⁵	6,26 x 10 ⁻¹⁵	6,08 x 10 ⁻¹⁵	6,11 x 10 ⁻¹⁵	6,23 x 10 ⁻¹⁵
130	6,27 x 10 ⁻¹⁶	6,26 x 10 ⁻¹⁶	6,08 x 10 ⁻¹⁶	6,11 x 10 ⁻¹⁶	6,23 x 10 ⁻¹⁶

Tabulka 12: Koncentrace kalibračních křivek pro jednotlivé geny

4. 3. 2. Kvantifikace pomocí qPCR

K samotné amplifikaci byla použita směs o celkovém objemu 9,96 μl složená z 0,03 μl každého primeru, 5 μl KAPA SYBR[®] Fast Master Mix (2x) Universal (obsahující barvivo SYBR green), 3,9 μl vody a 1 μl DNA. Primery byly použity z tabulky 10 v kapitole 4. 2. 1. (bez podtržených sekvencí). Pro relativní kvantifikaci byl použit gen pro 16S rRNA, primery jsou uvedeny v tabulce 13. DNA testovaných vzorků byla na základě naměřených koncentrací přístrojem Synergy HTX (BioTek) naředěna vodou na koncentraci 5 ng/μl. Pro srovnání výsledků analýz napříč destičkami byla použita interplate control (naředěný vyizolovaný plazmid obsahující daný gen). Všechny vzorky (včetně kalibrační řady, interplate control a negativní kontroly) byly pipetovány v duplikátech.

Název	Sekvence primeru	Délka (bp)
q16S-univF	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	146
q16S-univR	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	

Tabulka 13: Primery pro gen pro 16S rRNA

Na začátku byla potřebná optimalizace podmínek amplifikace, kdy bylo vyzkoušeno různé rozmezí teplot pro nasedání jednotlivých primerů tak, aby nevznikaly nespecifické produkty (ověřováno pomocí křivek teploty tání). Pro gen *cdt* se nepodařilo podmínky optimalizovat, proto musel být vyřazen. Výsledné zvolené podmínky reakce pro zbylé geny jsou uvedeny v tabulce 14. Pro samotnou qPCR byl použit přístroj real-time thermocycler Biometra. Všechny výsledky byly po skončení analýz normalizovány na efektivitu reakce a interplate control.

Krok	Parametry jednotlivých kroků				Počet cyklů
	<i>E1, E1*</i>	<i>cnf-1</i>	<i>pks</i>	<i>16S</i>	
Počáteční denaturace	3 min	3 min	3 min	3 min	1
	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	
Denaturace	3 s	3 s	3 s	2 s	40
	95 °C	95 °C	94 °C	95 °C	
Nasedání primerů	20 s	20 s	30 s	20 s	40
	51 °C	62 °C	63 °C	64,6 °C	
Extenze	30 s	30 s	40 s	20 s	40
	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C	

Tabulka 14: Programy qPCR u použitých genů

4. 4. Statistické vyhodnocení

Sloupcové grafy a tabulky byly tvořeny v programu Excel, krabicový graf a asociační grafy ve statistickém programu Statistica 13. V tomto statistickém programu byla i ověřována normalita dat s využitím Shapirova-Wilkovova testu a na základě jeho výsledků byl pro ověřování hypotéz o rozdělení pravděpodobnosti sledovaných veličin zvolen Mann-Whitneyův test.

7. Závěr

Cílem diplomové práce Výskyt genů kódujících cyklomoduliny u pacientů s kolorektálním karcinomem bylo shrnout poznatky o fekálním mikrobiomu pacientů s CRC a porovnat je se zdravými jedinci. Má práce zahrnovala izolaci DNA ze vzorků stolice zdravých jedinců. Z těchto vzorků (i části vzorků od pacientů) byl amplifikován metodou PCR gen pro 16S rRNA a dále zpracován pro sekvenční analýzu. Tento gen je běžně používaný pro taxonomické určení bakterií ve vzorku a z jeho sekvenování lze určit nejen bakteriální složení, ale i diverzita obsažená v konkrétním vzorku. Pro zjištění obsahu vybraných genů poškozujících hostitelské buňky (*E1*, *E1**, *cnf-1*, *cdt* a *pks*) byla provedena qPCR, a to v podobě absolutní i relativní kvantifikace (referenčním genem byl gen pro 16S rRNA). Pro absolutní kvantifikaci (k získání kalibrační řady) bylo provedeno klonování do vektoru.

Největší část pozorování byla věnována rozdílům ve stolicích, ale v jedné kapitole bylo porovnáno pár bakteriálních rodů i ve vzorcích tumoru a střeru ze zdravé tkáně. Jsou to ovšem od stolice zcela odlišná prostředí, proto je jejich porovnávání značně složité. Obzvláště u tumoru a stolice zdravých jedinců je těžké odhadnout, do jaké míry se složení liší kvůli odlišným podmínkám a do jaké míry je to způsobeno právě probíhajícím onemocněním. Pro další práci by tedy bylo zajímavé porovnat mnou zvolené geny spíše mezi tumorem a zdravou tkání.

Z výsledků mé práce lze vyvodit, že se stolice zdravých jedinců a pacientů s CRC od sebe liší. Bylo pozorováno odlišné složení v mikrobiomu, kde byly u pacientů ve vyšší míře zastoupeny patogenní druhy. Ve stolici pacientů byl také výrazně zvýšený výskyt kmene *Proteobacteria*, do něhož patří i některé významné lidské patogeny (např. *Escherichia* a *Salmonella*). Patrný rozdíl byl i v detekovaných genech – obou cyklomodulinech (*cnf-1* a *pks*) a variantě kolicinu E1.

Porovnáním vzorků od zdravých jedinců a pacientů bylo zjištěno, že se onemocnění CRC odráží i na bakteriálním složení. Ve stolici zdravých jedinců se vyskytovaly rody, které jsou pro ni typické. Oproti stolici od pacientů docházelo nejen k posunům v relativním výskytu, ale i k přítomnosti odlišných bakteriálních rodů a patogenních kmenů.

8. Summary

The aim of the diploma thesis Prevalence of cyclomodulin-encoding genes in patients with colorectal carcinoma was to summarize the knowledge about the fecal microbiome of patients with CRC and compare them with healthy individuals. My work involved isolating DNA from stool samples from healthy individuals. From these samples (as well as parts of samples from patients), the gene for 16S rRNA was amplified by PCR and further processed for sequence analysis. This gene is commonly used for the taxonomic determination of bacteria in a sample, and its sequencing can determine not only the bacterial composition but also the diversity contained in a particular sample. To determine the content of selected host cell-damaging genes (E1, E1*, *cnf-1*, *cdt*, and *pks*), qPCR was performed in the form of absolute and relative quantification (the reference gene was the gene for 16S rRNA). For absolute quantification (to obtain a calibration series), cloning into a vector was performed.

Most of the observations were devoted to differences in stools, but in one chapter a pair of bacterial genera were compared in tumour and smear samples from healthy tissue. However, these are completely different environments from the stool, so their comparison is very difficult. Especially in tumours and stools of healthy individuals, it is difficult to estimate to what extent the composition differs due to different conditions and to what extent it is caused by the current disease. For further work, it would be interesting to compare the genes I selected rather between the tumour and healthy tissue.

From the results of my work, it can be concluded that the stools of healthy individuals and patients with CRC differ from each other. A different composition was observed in the microbiome, where pathogenic species were more prevalent in patients. There was also a marked increase in the stool of *Proteobacteria* in the stool of patients, which also includes some important human pathogens (e.g. *Escherichia* and *Salmonella*). There was also a noticeable difference in the detected genes – both cyclomodulins (*cnf-1* and *pks*) and the colicin E1 variant.

By comparing samples from healthy individuals and patients, it was found that CRC disease is also reflected in the bacterial composition. In the stool of healthy individuals, some genera were typical of it. Compared to faeces from patients, there were not only shifts in relative incidence but also the presence of different bacterial genera and pathogenic strains.

9. Literatura

Alhinai E. A., Walton G. E., Commane D. M. 2019. The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (21): 5295.

Ambrosi C., Sarshar M., Aprea M. R., Pompilio A., Di Bonaventura G., Strati F., Pronio A., Nicoletti M., Zagaglia C., Palamara A. T., Scribano D. 2019. Colonic adenoma-associated *Escherichia coli* express specific phenotypes. *Microbes Infect.* 21 (7): 305-312.

Arnaud C. H. 2019. Closing in on the elusive colibactin toxin. *Chem. Eng. News.* 97 (40): 22-23.

Arthur J. C., Perez-Chanona E., Mühlbauer M., Tomkovich S., Uronis J. M., Fan T. J., Campbell B. J., Abujamel T., Dogan B., Rogers A. B., Rhodes J. M., Stintzi A., Simpson K. W., Hansen J. J., Keku T. O., Fodor A. A., Jobin C. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 338 (6103): 120-123.

Arthur J. C., Gharaibeh R. Z., Mühlbauer M., Perez-Chanona E., Uronis J. M., McCafferty J., Fodor A. A., Jobin C. 2014. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat. Commun.* 5: 4724.

Bäckhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A., Gordon J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 307 (5717):1915-1920.

Blumenthal B., Hoffman C., Aktories K., Backert S., Schmidt G. 2007. The cytotoxic necrotizing factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* bind to different cellular receptors but take the same route to the cytosol. *Infect. Immun.* 75 (7): 3344-3353.

Bonnet M., Buc E., Sauvanet P, Darcha C., Dubois D., Pereira B., Déchelotte P., Bonnet R., Pezet D., Darfeuille-Michaud A. 2014. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res.* 20 (4): 859-867.

Boquet P. 2001. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon.* 39 (11): 1673-1680.

Brückner V., Fiebiger U., Ignatius R., Friesen J., Eisenblätter M., Höck M., Alter T., Bereswill S., Heimesaat M. M., Götz G. 2020. Characterization of *Arcobacter* strains isolated

from human stool samples: results from the prospective German prevalence study Arcopath. Gut Pathog. doi: 10.1186/s13099-019-0344-3.

Buc E., Dubois D., Sauvanet P., Raisch J., Delmas J., Darfeuille-Michaud A., Pezet D., Bonnet R. 2013. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. PLoS One. 8 (2): e56964

Cascales E., Buchanan S. K., Duché D., Kleanthous C., Llobès R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. 2007. Colicin biology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71 (1): 158-229.

Charpentier X., Oswald E. 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. J. Bacteriol. 186 (16): 5486-5495.

Chumchalová J., Šmarda J. 2003. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. Folia Microbiol. (Praha). 48 (1): 111-115.

Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3 (10): 777-788.

Cougnoux A., Dalmaso G., Martinez R., Buc E., Delmas J., Gibold L., Sauvanet P., Darcha C., Déchelotte P., Bonnet M., Pezet D., Wodrich H., Darfeuille-Michaud A., Bonnet R. 2014. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. Gut. 63 (12): 1932-1942.

Cuevas-Ramos G., Petit C. R., Marcq I., Boury M., Oswald E., Nougayrède J. P. 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107 (25): 11537-11542.

Dalmaso G., Cougnoux A., Delmas J., Darfeuille-Michaud A., Bonnet R. 2014. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by modifying the tumour microenvironment. Gut Microbes. 5 (5): 675-680.

Davis C. D., Milner J. A. 2009. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. J. Nutr. Biochem. 20 (10): 743-752.

De Luca A., Iaquinto G. 2004. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. Cancer Lett. 213 (1): 1-10.

de Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M. 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 13 (6): 607-615.

Dejea C. M., Sears C. L. 2016. Do biofilms confer a pro-carcinogenic state? *Gut Microbes.* 7 (1): 54-57.

Dejea C. M., Fathi P., Craig J. M., Boleij A., Taddese R., Geis A. L., Wu X., DeStefano Shields C. E., Hechenbleikner E. M., Huso D. L., Anders R. A., Giardiello F. M., Wick E. C., Wang H., Wu S., Pardoll D. M., Housseau F., Sears C. L. 2018. Patients with familial adenomatous polyposis harbour colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science.* 359 (6375): 592-597.

Domingue J. C., Drewes J. L., Merlo C. A., Housseau F., Sears C. L. 2020. Host responses to mucosal biofilms in the lung and the gut. *Mucosal Immunol.* doi: 10.1038/s41385-020-0270-1.

Doye A., Mettouchi A., Bossis G., Clément R., Buisson-Touati C., Flatau G., Gagnoux L., Piechaczyk M., Boquet P., Lemichez E. 2002. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell.* 111 (4): 553-564.

Eaden J. A., Abrams K. R., Mayberry J. F. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 48 (4): 526-535.

Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E., Relman D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308 (5728): 1635-1638.

Emlet C., Ruffin M., Lamendella R. 2020. Enteric virome and carcinogenesis in the gut. *Dig. Dis. Sci.* 65 (3): 852-864.

Fabrizi A., Falzano L., Travaglione S., Stringaro A., Malorni W., Fais S., Fiorentini C. 2002. Rho-activating *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: macropinocytosis of apoptotic bodies in human epithelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 291 (6-7): 551-554.

Fabrizi A., Travaglione S., Rosadi F., Ballan G., Maroccia Z., Giambenedetti M., Guidotti M., Ødum N., Krejsgaard T., Fiorentini C. 2020. The *Escherichia coli* protein toxin

cytotoxic necrotizing factor 1 induces epithelial mesenchymal transition. *Cell Microbiol.* 22 (2): e13138.

Feng Q., Liang S. S., Jia H. J., Stadlmayr A., Tang L. Q., Lan Z., Zhang D. Y., Xia H. H., Xu X. Y., Jie Z. Y., Su L. L., Li X. P., Li X., Li J. H., Xiao L., Huber-Schonauer U., Niederseer D., Xu X., Al-Aama J. Y., Yang H. M., Wang J., Kristiansen K., Arumugam M., Tilg H., Datz C., Wang J. 2015. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat. Commun.* 6. DOI: 10.1038/ncomms7528

Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Pineros M., Znaor A., Bray F. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer.* 144 (8): 1941-1953.

Fiorentini C., Matarrese P., Straface E., Falzano L., Fabbri A., Donelli G., Cossarizza A., Boquet P., Malorni W. 1998. Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp. Cell. Res.* 242 (1): 341-350.

Frank D. N., St Amand A. L., Feldman R. A., Boedeker E. C., Harpaz N., Pace N. R. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 (34): 13780-13785.

Gagnière J., Raisch J., Veziat J., Barnich N., Bonnet R., Buc E., Bringer M. A., Pezet D., Bonnet M. 2016. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J. Gastroentero.* 22 (2): 501-518.

George K. M., Chatterjee D., Gunawardana G., Welty D., Hayman J., Lee R., Small P. L. 1999. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science.* 283 (5403): 854-857.

Gómez-Moreno R., Robledo I. E., Baerga-Ortiz A. 2014. Direct detection and quantification of bacterial genes associated with inflammation in DNA isolated from stool. *Adv. Microbiol.* 4 (15): 1065-1075.

Grozdanov L., Raasch C., Schulze J., Sonnenborn U., Gottschalk G., Hacker J., Dobrindt U. 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* 186 (16): 5432-5441.

- Guerra L., Teter K., Lilley B. N., Stenerlöv B., Holmes R. K., Ploegh H. L., Sandvig K., Thelestam M., Frisan T.** 2005. Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell Microbiol.* 7 (7): 921-934.
- Guo C. J., Chang F. Y., Wyche T. P., Backus K. M., Acker T. M., Funabashi M., Taketani M., Donia M. S., Nayfach S., Pollard K. S., Craik C. S., Cravatt B. F., Clardy J., Voigt C. A., Fischbach M. A.** 2017. Discovery of reactive microbiota-derived metabolites that inhibit host proteases. *Cell.* 168 (3): 517-526.
- Haghjoo E., Galán J. E.** 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (13): 4641-4649.
- Healy A. R., Nikolayevskiy H., Patel J. R., Crawford J. M., Herzon S. B.** 2016. A mechanistic model for colibactin-induced genotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 138 (48): 15563-15570.
- Hollister E. B., Gao C. X., Versalovic J.** 2014. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology.* 146 (6): 1449-1458.
- Huynh T., Kapur R. V., Kaplan C. W., Cacalano N., Kinder Haake S., Shi W., Sieling P., Jewett A.** 2011. The role of aggregation in *Fusobacterium nucleatum*-induced immune cell death. *J. Endod.* 37 (11): 1531-1535.
- Jewett A., Hume W. R., Le H., Huynh T. N., Han Y. W., Cheng G., Shi W.** 2000. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. *Infect. Immun.* 68 (4): 1893-1898.
- Kawanishi M., Hisatomi Y., Oda Y., Shimohara C., Tsunematsu Y., Sato M., Hirayama Y., Miyoshi N., Iwashita Y., Yoshikawa Y., Sugimura H., Mutoh M., Ishikawa H., Wakabayashi K., Yagi T., Watanabe K.** 2019. *In vitro* genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. *J. Toxicol. Sci.* 44 (12): 871-876.
- Kohoutová D., Bureš J.** 2013. Střevní mikrobiota a kolorektální karcinom. *Interní Med.* 15 (5): 167-169.

- Kohoutová D., Smajs D., Moravkova P., Cyrany J., Moravkova M., Forstlova M., Cihak M., Rejchrt S., Bures J.** 2014. *Escherichia coli* strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. *BMC Infect. Dis.* 14:733.
- Kohoutová D., Forstlova M., Moravkova P., Cyrany J., Bosak J., Smajs D., Rejchrt S., Bures J.** 2020. Bacteriocin production by mucosal bacteria in current and previous colorectal neoplasia. *BMC Cancer.* 20 (1): 39.
- Kostic A. D., Chun E. Y., Robertson L., Glickman J. N., Gallini C. A., Michaud M., Clancy T. E., Chung D. C., Lochhead P., Hold G. L., El-Omar E. M., Brenner D., Fuchs C. S., Meyerson M., Garrett W. S.** 2013. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe.* 14 (2): 207-15.
- Lee H. C., Jenner A. M., Low C. S., Lee Y. K.** 2006. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res. Microbiol.* 157 (9): 876-884.
- Li S., Spooner R. A., Allen S. C., Guise C. P., Ladds G., Schnöder T., Schmitt M. J., Lord J. M., Roberts L. M.** 2010. Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell.* 21 (15): 2543-2554.
- Lucas C., Salesse L., Hoang M. H. T., Bonnet M., Sauvanet P., Larabi A., Godfraind C., Gagnière J., Pezet D., Rosenstiel P., Barnich N., Bonnet R., Dalmasso G., Nguyen H. T. T.** 2020. Autophagy of intestinal epithelial cells inhibits colorectal carcinogenesis induced by colibactin-producing *Escherichia coli* in *Apc^{Min/+}* mice. *Gastroenterology.* 158 (5): 1373-1388.
- Maddocks O. D., Short A. J., Donneberg M. S., Bader S., Harrison D. J.** 2009. Attaching and effacing *Escherichia coli* downregulate DNA mismatch repair protein *in vitro* and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans. *PLoS One.* 4 (5): e5517.
- Mahtal N., Wu Y., Cintrat J. C., Barbier J., Lemichez E., Gillet D.** 2020. Revisiting old ionophore lasalocid as a novel inhibitor of multiple toxins. *Toxins (Basel).* doi: 10.3390/toxins12010026.
- Marchès O., Ledger T. N., Boury M., Ohara M., Tu X., Goffaux F., Mainil J., Rosenshine I., Sugai M., de Rycke J., Oswald E.** 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic

Escherichia coli deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. Mol. Microbiol. 50 (5): 1553-1567.

Marini R. P., Taylor N. S., Liang A. Y., Knox K. A., Peña J. A., Schauer D. B., Fox J. G. 2004. Characterization of hemolytic *Escherichia coli* strains in ferrets: recognition of candidate virulence factor CNF1. J. Clin. Microbiol. 42 (12): 5904-5908.

Maynard C., Weinkove D. 2020. Bacteria increase host micronutrient availability: mechanisms revealed by studies in *C. elegans*. Genes Nutr. 15 (1): 4.

Micenková L. 2016. Bakteriocinogenie u patogenních a komensálních kmenů *Escherichia coli*. Disertační práce. <https://is.muni.cz/auth/th/j4kma/>

Nougayrède J. P., Boury M., Tasca C., Marchès O., Milon A., Oswald E., de Rycke J. 2001. Type III secretion-dependent cell cycle block caused in HeLa cells by enteropathogenic *Escherichia coli* O103. Infect. Immun. 69 (11): 6785-6795.

Nougayrède J. P., Taieb F., De Rycke J., Oswald E. 2005. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. Trends Microbiol. 13 (3): 103-110.

Nougayrède J. P., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Buchrieser C., Hacker J., Dobrindt U., Oswald E. 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. Science. 313 (5788): 848-851.

Olier M., Marcq I., Salvador-Cartier C., Secher T., Dobrindt U., Boury M., Bacquié V., Pénary M., Gaultier E., Nougayrède J. P., Fioramonti J., Oswald E. 2012. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. Gut Microbes. 3 (6): 501-509.

Oswald E., Nougayrède J. P., Taieb F., Sugai M. 2005. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. Curr. Opin. Microbiol. 8 (1): 83-91.

Pahlevan A. A., Wright D. J., Andrews C., George K. M., Small P. L., Foxwell B. M. 1999. The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte / T cell cytokine production and NF-kappa B function. J. Immunol. 163 (7): 3928-3935.

Palmisano S., Campisciano G., Iacuzzo C., Bonadio L., Zucca A., Cosola D., Comar M., de Manzini N. 2020. Role of preoperative gut microbiota on colorectal anastomotic leakage: preliminary results. Updates Surg. doi: 10.1007/s13304-020-00720-x.

- Patel H. G., Tabassum S., Shaikh S.** 2017. *E. coli* sepsis: Red flag for colon carcinoma – a case report and review of the literature. *Case Rep. Gastrointest. Med.* 2017: 2570524.
- Plummer M., de Martel C., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Franceschi S.** 2016. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob. Health.* 4 (9): e609-616.
- Riley M. A., Tan Y., Wang J.** 1994. Nucleotide polymorphism in colicin E1 and *la* plasmids from natural isolates of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (23): 11276-11280.
- Ruan W., Engevik M. A., Spinler J. K., Versalovic J.** 2020. Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration. *Dig. Dis. Sci.* 65 (3): 695-705.
- Rubinstein M. R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y. W.** 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signalling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe.* 14 (2): 195-206.
- Schulz M. D., Atay C., Heringer J., Romrig F. K., Schwitalla S., Aydin B., Ziegler P. K., Varga J., Reindl W., Pommerenke C., Salinas-Riester G., Böck A., Alpert C., Blaut M., Polson S. C., Brandl L., Kirchner T., Greten F. R., Polson S. W., Arkan M. C.** 2014. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature.* 514 (7523): 508-512.
- Schwabe R. F., Jobin C.** 2013. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 13 (11): 800-812.
- Sears C. L., Islam S., Saha A., Arjumand M., Alam N. H., Faruque A. S., Salam M. A., Shin J., Hecht D., Weintraub A., Sack R. B., Qadri F.** 2008. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 47 (6): 797-803.
- Sekirov I., Russell S. L., Antunes L. C., Finlay B. B.** 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90 (3): 859-904.
- Shen X. J., Rawls J. F., Randall T., Burcal L., Mpande C. N., Jenkins N., Jovov B., Abdo Z., Sandler R. S., Keku T. O.** 2010. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes.* 1 (3): 138-147.

- Shenker B. J., Datar S.** 1995. *Fusobacterium nucleatum* inhibits human T-cell activation by arresting cells in the mid-G1 phase of the cell cycle. *Infect. Immun.* 63 (12): 4830-4836.
- Spooner R. A., Smith D. C., Easton A. J., Roberts L. M., Lord J. M.** 2006. Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Viol. J.* 3: 26.
- Spooner R. A., Lord J. M.** 2012. How ricin and Shiga toxin reach the cytosol of target cells: retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 357: 19-40.
- Su Z., Ho D., Merrill A. R., Lipkowski J.** 2019. *In situ* Electrochemical and PM-IRRAS studies of colicin E1 ion channels in the floating bilayer lipid membrane. *Langmuir.* 35 (25): 8452-8459.
- Šmajš D., Karpathy S. E., Šmarda J., Weinstock G. M.** 2002. Colicins produced by the *Escherichia fergusonii* strains closely resemble colicins encoded by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 208 (2): 259-262.
- Šmajš D., Micenková L., Šmarda J., Vrba M., Ševčíková A., Vališová Z., Woznicová V.** 2010. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol.* 10: 288.
- Šmarda J.** 1978. The effect of colicins. *Universita J. E. Purkyně. Brno.* str 213.
- Taieb F., Nougayrède J. P., Watrin C., Samba-Louaka A., Oswald E.** 2006. *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell Microbiol.* 8 (12): 1910-1921.
- Ternes D., Karta J., Tsenkova M., Wilmes P., Haan S., Letellier E.** 2020. Microbiome in colorectal cancer: How to get from meta-omics to mechanism? *Trends Microbiol.* 28 (5): 401-423.
- Twittenhoff C., Heroven A. K., Mühlen S., Dersch P., Narberhaus F.** 2020. An RNA thermometer dictates production of secreted bacterial toxin. *PLoS Pathog.* 16 (1): e1008184.
- Vizcaino M. I., Crawford J. M.** 2015. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat. Chem.* 7 (5): 411-417.

Wallace B. D., Wang H., Lane K. T., Scott J. E., Orans J., Koo J. S., Venkatesh M., Jobin C., Yeh L. A., Mani S., Redinbo M. R. 2010. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science*. 330 (6005): 831-835.

Wilson M. R., Jiang Y., Villalta P. W., Stornetta A., Boudreau P. D., Carrá A., Brennan C. A., Chun E., Ngo L., Samson L. D., Engelward B. P., Garrett W. S., Balbo S., Balskus E. P. 2019. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science*. doi: 10.1126/science.aar7785.

Yimagou E. K., Baudoin J. P., Abou Abdallah R., Di Pinto F., Bou Khalil J. Y., Raoult D. 2020. Full-repertoire comparison of the microscopic objects composing the human gut microbiome with sequenced and cultured communities. *J. Microbiol.* doi: 10.1007/s12275-020-9365-3.

Yu A. I., Zhao L., Eaton K. A., Ho S., Chen J., Poe S., Becker J., Gonzalez A., McKinstry D., Hasso M., Mendoza-Castrejon J., Whitfield J., Koumpouras C., Schloss P. D., Martens E. C., Chen G. Y. 2020. Gut microbiota modulate CD8 T cell responses to influence colitis-associated tumorigenesis. *Cell Rep.* 31 (1): 107471.

Zackular J. P., Baxter N. T., Iverson K. D., Sadler W. D., Petrosino J. F., Chen G. Y., Schloss P. D. 2013. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio.* 4 (6): e00692-13.

Zhang Z., Aung K. M., Uhlin B. E., Wai S. N. 2018. Reversible senescence of human colon cancer cells after blockage of mitosis / cytokinesis caused by the CNF1 cyclomodulin from *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8 (1): 17780.

Zhu Q., Gao R., Wu W., Qin H. 2013. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol.* 34 (3): 1285-1300.

Zywietz A., Gohla A., Schmelz M., Schultz G., Offermanns S. 2001. Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. Involvement of Gq but not G11. *J. Biol. Chem.* 276 (6): 3840-3845.

10. Přílohy

10. 1. Příloha 1 – Izolace DNA ze stěrů stolice / sliznice kolon

(MOBIO PowerSoil DNA Isolation Kit)

1. Pokud jsou stěrové štětičky kompletní – odstříhnout sterilně spodní část se stěrem do zkumavky (takto je možné uchovávat vzorky v -80 °C v krabičce).
2. Přidat **Bead Solution** ze zkumavek s drtí.
3. Vortexovat, rychlost 3, 2 minuty.
4. Přidat 60 µl **Solution C1** a vortexovat, rychlost 3, 2 minuty.
5. Sterilně nastříhat špičky do popsaných zkumavek a pinzetou sterilně vložit stěr do špičky, zavřít zkumavku.
6. Stočit při RT, 14 000 g, 4 minuty.
7. Vyhodit špičky se stěrovkou a eluát sterilně přenést společně s ostatním vzorkem do **Bead Tube**.
8. Upevnit zkumavky horizontálně na vortex a vortexovat na maximální rychlost, 10 min.
9. Stočit při RT na 10 000 g, 30 vteřin.
10. Přenést celý supernatant do čisté dvoumilitrové zkumavky.
11. Přidat 250 µl **Solution C2** a vortexovat 5 vteřin.
12. Inkubovat na ledu 5 minut.
13. Stočit při RT, 10 000 g, 1 minutu.
14. Přenést až 600 µl supernatantu do dvoumilitrové zkumavky.
15. Přidat 200 µl **Solution C3** a vortexovat.
16. Inkubovat na ledu 5 minut.
17. Stočit při RT, 10 000 g, 1 minutu.
18. Přenést 750 µl supernatantu do dvoumilitrové zkumavky.
19. Přidat 1 µl RNÁzy (25 mg/ml) a inkubovat 2 minuty při RT.
20. Protřepat **Solution C4** před použitím a přidat 1,2 ml k supernatantu, vortexovat 5 vteřin.
21. Nanést 675 µl na **Spin Filter** kolonku a stočit při RT, 10 000 g, 1 minutu.
22. Opakovat dokud není celý supernatant nanesený na kolonku.
23. Promýt kolonku 500 µl **Solution C5** a stočit při RT, 10 000 g, 30 vteřin.
24. Vylít proteklý roztok.
25. Stočit při RT, 10 000 g, 1 minutu.
26. Opatrně přenést kolonku do čisté zkumavky tak, aby se dovnitř nedostal **Solution 5**.
27. Přidat 50 µl **Solution C6** do středu membrány a nechat stát 5 minut.
28. Stočit při RT, 10 000 g, 30 vteřin.
29. Eluát znova nanést na střed membrány, nechat stát 5 minut.
30. Stočit při RT, 10 000 g, 30 vteřin.
31. Uchovat v mrazáku (-20 °C krátkodobě / -80 °C dlouhodobě).

10. 2. Příloha 2 – Horizontální systém pro elektroforézu

Potřebné chemikálie a pomůcky:

Pipety, rukavice, špičky, elektroforetická nádrž, víko, kabely, mikrovlnná trouba, UV zobrazovací zařízení Azure c200 (Azure Biosystems), váhy, kónická láhev, odměrný válec, odlévací přepážky, hřebeny, agarózový prášek (VWR Chemicals), TAE pufr, GelRed (Biotinum), Gel Loading Dye Purple (6X) (New England BioLabs), 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs), 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs), stojánek na biologický odpad.

Postup:

Příprava gelu

- Objem agarózového roztoku potřebný k přípravě požadovaného agarózového gelu závisí na velikosti tácu.
- Vložit prášek do kónické láhve a přidat roztok 1x TAE.
- Agarózový prášek rozpustit v mikrovlnné troubě, přidat GelRed.

Nalévání gelu

- Odlévací přepážky umístit na každém konci tácu a umístit je na rovný povrch. Vložit hřebeny do drážek.
- Agarózový polotovár nalévat opatrně tak, aby nevznikaly bublinky. Nechat agarózu usadit, je třeba přitom zajistit, aby gel zůstal v klidu.
- Opatrně odstranit odlévací dvířka a hřebeny z gelu a gel společně s tácem přenést do hlavní nádrže.

Práce s gelem

- Vzorky smíchat se vzorkovým pufrém, pomocí pipet jej vložit do jamek.
- Do jedné z jamek pipetovat příslušný ladder (1kb DNA Ladder pro gDNA, 100bp DNA Ladder pro amplikony).
- Opatrně položit víko na nádrž a zařízení připojit k napájecímu zdroji, typické gely se zpracovávají napětím v rozmezí od 90 do 150 V, po uplynutí času fotit v zobrazovacím zařízení.

10. 3. Příloha 3 – První kolo amplifikace 16S rRNA

Potřebné chemikálie a pomůcky:

Pre-PCR box, pipety, špičky, rukavice, polymeráza (mastermix), molecular grade water, primery, led, vortex Genie 2 (Scientific Industries), centrifuga Sigma 1-14 (Sigma), stripy, plastové zkumavky, stojánek na stripy a plastové zkumavky, stojánek na biologický odpad.

Postup:

Příprava boxu

- Vystříkat etanolem nebo přípravkem na odstranění DNA.
- Nechat vysvítit 15 minut UV světlem.

Výpočet množství PCR směsi

Poznámka: K celkovému počtu reakcí je nutné připočítat pozitivní a negativní kontrolu + 1 reakci navíc na každých 10 vzorků (pipetovací chyba).

Příprava reakční směsi

Příprava v Pre-PCR boxu

- Polymerázu vytáhnout z mrazáku a nechat rozmrazit na ledu.
Poznámka: Doporučuje se před nebo během vysvícení boxu, některé polymerázy, případně DMSO roztávají déle.
- Do sterilní plastové zkumavky pipetovat spočítaný objem složek reakce (polymeráza mastermix, voda, případně DMSO), vortexovat, stočit.
- Spočítané množství pipetovat do stripu, přidat primery.
- Do zkumavky s negativní kontrolou přidat vodu (stejný objem jako přidávané DNA).

Příprava DNA

- Mimo PCR box do stripu pipetovat DNA, vortexovat, stočit (aby v roztoku nebyly žádné bublinky).
- Vložit do cycleru a spustit příslušný program.

Úklid

- Pre-PCR box vyčistit etanolem nebo přípravkem na odstranění DNA.
- Nechat vysvítit 15 minut UV světlem.
- Pracovní plochu pro práci s DNA rovněž vyčistit etanolem.

10. 4. Příloha 4 – Clean up po 1. kole PCR

Potřebné chemikálie a pomůcky:

Magnetické kuličky AMPure XP beads (Agencourt), MIDI destička, vortex Genie 2 (Scientific Industries), třepačka MPS-1 (Biosan), vaničky pro multikanálovou pipetu, pipety, špičky, etanol, 10 mM TE pufr, fólie na přelepení destičky, stojánek na biologický odpad.

Postup:

Příprava před přečištěním

- Temperace magnetických kuliček (AMPure XP beads) na pokojovou teplotu.
- Vyčistit Post-PCR box a zapnout UV přibližně na 15 min.
- Do plastové 50 ml falkony odlijeme 5 ml H₂O a do 25 ml dolijeme absolutním etanolem nebo jiné vypočtené množství.
- Strip / destičku s amplikony vortexovat a stočit.

Přečištění amplikonů

- Amplikony přenést na MIDI destičku, přidat k nim AMPure XP beads, promíchat, inkubovat při RT 5 min, položit destičku na magnetický stojánek, ponechat ji zde po dobu 2 min, nebo dokud se supernatant neprojasní.
- Odstranit supernatant – POZOR na odstranění kuliček, zkontrolovat, zda nejsou vidět ve špičce!
- 1. promytí
 - o Do jamek pipetovat 180 µl 80% etanolu.
 - o Inkubovat destičku na magnetickém stojánku po dobu 30 s, odstranit supernatant.
- 2. promytí
 - o Do jamek pipetovat 180 µl 80% etanolu, inkubovat na magnetickém stojánku 30 s, odstranit supernatant.
- Destičku ponechat na magnetickém stojánku do té doby, než se začne měnit struktura nánosu kuliček (popraskání).
- Destičku sundat z magnetického stojánku, přidat TE pufr, destičku zalepit a dát na třepačku – 1800 RPM, 2 min.
- Inkubovat destičku při RT po dobu 5 min, přenést na magnetický stojánek a ponechat ji tam po dobu 2 min, přenést supernatant z destičky do stripu.

10. 5. Příloha 5 – Indexační PCR

Potřebné chemikálie a pomůcky:

Pre-PCR box, Post-PCR box, pipety, špičky, rukavice, polymeráza (mastermix), molecular grade water, primery, led, centrifuga Sigma 1-14 (Sigma), vortex Genie 2 (Scientific Industries), stripy, zkumavky, stojánek na stripy a zkumavky, stojánek na biologický odpad.

Postup:

Příprava boxu

- Uvést post-PCR a pre-PCR box do provozu.
- Nechat vysvítit 15 minut UV světlem.

Výpočet množství PCR směsi

Chemikálie	Objem (μl)
2x Kapa Hifi HotStart Ready Mix	25
Nextera XT Index Primer 1 (N)	5
Nextera XT Index Primer 1 (S)	5
H ₂ O	5 až 14
DNA	1 až 10
Total	50

Vzorky o konc.	Objem DNA v reakci (μl)
5 ng/μl	10
10 ng/μl	5
50 ng/μl	2
200 ng/μl	1

Příprava reakční směsi

Příprava v Pre-PCR boxu

- Spočítané množství složek reakcí pipetovat do stripu.
- Přidat primery (pozor na kontaminaci při pipetování), zvortexovat a stočit.

Příprava

- V Post-PCR boxu do stripu přidat připravené pooly (vzorky rozdělené do poolů – 16S amplicony podle fluorometricky odměřené koncentrace), zvortexovat a stočit, vložit do cycleru a spustit příslušný program (8 cyklů).

Úklid

- Sáček s odpadem zalepit páskou a vyhodit do koše na biologický odpad.
- Post-PCR a Pre-PCR box vystříkat etanolem nebo přípravkem na odstranění DNA.
- Nechat vysvítit 15 minut UV světlem.

10. 6. Příloha 6 – Clean up po indexaci

Potřebné chemikálie a pomůcky:

Magnetické kuličky AMPure XP beads (Agencourt), MIDI destička, vaničky pro multikanálovou pipetu, vortex Genie 2 (Scientific Industries), třepačka MPS-1 (Biosan), pipety, špičky, etanol, 10 mM TE pufr, MIDI destička, fólie na přelepení destičky, stojánek na biologický odpad.

Postup:

Příprava před přečištěním

- Temperace magnetických kuliček (AMPure XP beads) na pokojovou teplotu.
- Vyčistit Post-PCR box a zapnout UV přibližně na 15 minut.
- Do plastové 50 ml flakony odlít 5 ml H₂O a do 25 ml dolít absolutním etanolem nebo jiné vypočtené množství.
- Do boxu si připravit speciální vaničky pro multikanálovky, magnetické kuličky, 80% etanol, 10 mM TE pufr, MIDI destičku, fólie na přelepení destičky.
- AMPure XP beads vortexovat minimálně po dobu 30 sekund.

Přečištění amplikonů po indexaci

- 45 µl amplikonů přenést na MIDI destičku.
- Do každého kanálku s amplikony přidat 36 µl AMPure XP beads, destičku zalepit a dát na třepačku, inkubovat destičku při RT po dobu 5 minut.
- Položit destičku na magnetický stojánek, ponechat ji zde po dobu 2 minut, nebo dokud se supernatant neprojasní.
- Odstranit supernatant – POZOR na odstranění kuliček, zkontrolovat, zda nejsou vidět ve špičce!
- 1. promytí
 - o Do kanálků pipetovat 180 µl 80% etanolu, inkubovat destičku na magnetickém stojánku po dobu 30 sekund.
 - o Odstranit supernatant multikanálovou pipetou.
- 2. promytí
 - o Do kanálků pipetovat 180 µl 80% etanolu, inkubovat destičku na magnetickém stojánku po dobu 30 sekund.
 - o Odstranit supernatant multikanálovou pipetou.
 - o Zbytky supernatantu odstranit s použitím 10µl pipety, supernatant NESMÍ v jamkách zůstat.
- Destičku sundat z magnetického stojánku, do jamek nanést 27,5 µl TE pufru.
- Destičku zalepit a dát na třepačku – 1800 RPM, 2 minuty.
- Inkubovat destičku při RT po dobu 5 minut, destičku ponechat na magnetickém stojánku po dobu 2 minut, nebo dokud se supernatant neprojasní, přenést 25 µl supernatantu z destičky do stripu.

Úklid

- Vyčistit box a zapnout UV na 15 minut.
- Sáček s biologickým odpadem vyhodit do speciálního koše na biologický odpad označený kódem 180103.

10. 7. Příloha 7 – Přečištění PCR produktů

(QIAquick® PCR Purification Kit)

1. K příslušnému PCR produktu pipetovat PB pufr (přibližně 5x větší množství, než je objem PCR produktu) a celkový objem přenést na kolonku příslušné komerční soupravy.
2. Centrifugovat po dobu 75 s na 14 100 g (centrifugace zabezpečí zachycení DNA PCR produktu na kolonce).
3. Po každém centrifugačním kroku odstranit proteklý roztok ze dvoumilitrové sběrné zkumavky a opětovně ji spojit s druhou částí zkumavky obsahující kolonku.
4. Následně na kolonku pipetovat 500 µl PB pufru a centrifugovat (75 s).
5. Protečený odpad ze zkumavky opět vylít a na kolonku pipetovat 750 µl PE pufru, vícenásobně opakovaně centrifugovat (75 s), aby se zabezpečilo úplné protečení PE pufru.
6. Odstranit sběrnou zkumavku a kolonku umístit do nové mikrocentrifugační zkumavky
7. Přečištěnou DNA PCR produktu z kolonky eluovat přidavkem 20 µl EB pufru předem nahřátým v termobloku na 50 °C.

10. 8. Příloha 8 – Transformační protokol pro buňky *E. cloni* 10G

Příprava na transformaci

Pro zajištění úspěšných výsledků transformace je třeba přijmout následující opatření:

- Buňky musí být před použitím úplně rozmrazeny na ledu.
- Proved'te tepelný šok v 15 ml polypropylenové kultivační zkumavce na jedno použití.

Transformační protokol pro buňky *E. cloni* 10G

1. Připravte si živné agarové plotny s antibiotikem pro selekci. Zajistěte, aby médium Recovery bylo snadno dostupné při pokojové teplotě.
2. Ochlazujte zkumavky se sterilní kulturou na ledu.
3. Vyjměte buňky *E. cloni* z mrazáku a rozmrazte je úplně na vlhkém ledu.
4. Do zchlazené kultivační zkumavky přidejte 40 μ l buněk *E. cloni*.
5. Přidejte 1 až 4 μ l vzorku DNA do 40 μ l buněk. Krátce zamíchejte špičkou pipety; nepipetujte nahoru a dolů, může to vytvořit vzduchové bubliny a zahřívání buněk. Pro kontrolu pUC19 přidejte 1 μ l DNA do další zchlazené kultivační zkumavky obsahující 40 μ l buněk.
6. Inkubujte směs buněk a DNA na ledu po dobu 30 minut.
7. Proved'te tepelný šok buněk umístěním kultivačních zkumavek do vodní lázně o teplotě 42 °C po dobu 45 sekund.
8. Kultivační zkumavky vraťte na led po dobu 2 minut.
9. K buňkám v kultivační zkumavce přidejte 960 μ l Recovery média při pokojové teplotě. Při použití těchto buněk s klonovací soupravou postupujte podle objemu Recovery média uvedeného v příručce u soupravy.
10. Zkumavky umístěte do třepacího inkubátoru při 250 otáčkách / minutu po dobu 1 hodiny při 37 °C.
11. Nasad'te až 200 μ l transformované směsi na LB-Lennox nebo na plotny obsahující vhodné antibiotikum. V závislosti na vaší DNA může být nutné optimalizovat objem. Pro kontrolu pUC19 se přidá 25 μ l 10G buněk na LB-Lennox agarové plotny obsahující 100 μ g/ml karbenicilinu nebo ampicilinu. Transformanty nanesené na LB-Miller mohou růst pomalu.
12. Inkubujte destičky přes noc při 37 °C.
13. Transformované klony mohou být dále pěstovány v jakémkoli bohatém kultivačním médiu.

10. 9. Příloha 9 – Izolace plazmidové DNA

(QIAprep® Spin Miniprep Kit)

1. Bakterie, z kterých má být izolovaná plazmidová DNA, kultivovat přes noc při teplotě 37 °C za neustálého třepání při 200 rpm.
2. Ráno kulturu pipetovat po 1,5 ml do čtyř mikrocentrifugačních zkumavek.
3. Po 10 minutách centrifugace na 14 100 g odstranit supernatant a k sedimentům ve dvou mikrocentrifugačních zkumavkách pipetovat 250 µl pufru P1 (P1 pufr + RNáza).
4. Sediment rozsuspendovat v pufru a přenést do zkumavky se sedimentem bez přidaného P1 pufru. Tento sediment opět rozsuspendovat. V tomto kroku se z každého vzorku získají místo původních čtyř mikrocentrifugačních zkumavek dvě zkumavky.
5. Přidat 250 µl P2 pufru a obsah promíchat převrácením zkumavky.
6. Pipetovat 350 µl N3 pufru, opět promíchat převrácením zkumavky a centrifugovat na 14 100 g (centrifugace zabezpečí zachycení plazmidové DNA na kolonce).
7. Přechistit DNA přidavkem 500 µl PB pufru, poté 750 µl PE pufru.
8. Po protečení PE pufru a jeho odstranění ze sběrné tuby kolonky provést ještě jednu centrifugaci (zabezpečí úplné odstranění zbytků pufrů).
9. Kolonku následně vybrat ze sběrné tuby a přemístit do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, do které se přidavkem 20 µl EB pufru a centrifugací (75 s na 14 100 g) eluuje plazmidová DNA.
10. Koncentraci izolované plazmidové DNA a její čistotu ověřit pomocí přístroje Nanodrop.