

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Lenka Čurnová

Role bakterie *Escherichia coli* v tumorigenezi kolorektálního karcinomu
The role of bacterium *Escherichia coli* in the tumorigenesis of colorectal
carcinoma

Diplomová práce

Školitelka: Mgr. Klára Klimešová, Ph.D.

Praha 2017

Prohlášení

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

V Praze, dne 27. 4. 2017

Lenka Čurnová

Poděkování

Ráda bych poděkovala školitelce své diplomové práce Mgr. Kláře Klimešové, Ph.D. za věnovaný čas, ochotu, trpělivost a cenné připomínky. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Miloslavu Kverkovi, Ph.D. za odborné rady a celému kolektivu Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za příjemné pracovní prostředí. Dále děkuji rodině za podporu během celého studia.

Diplomová práce vznikla za podpory grantu: 15-27580A – Vnímání chutí, oxidativní poškození a mikroprostředí střeva v kolorektální karcinogenezi: důsledky na riziko nemoci, jeho prognózu a prevenci (AZV ČR).

Abstrakt

Kolorektální karcinom je závažné onemocnění tlustého střeva. Patří mezi nádory s nejvyšší incidencí a zároveň je pro něj typická také vysoká mortalita. V procesu tumorigeneze se uplatňuje celá řada rozličných mechanismů, především poškození a následná reparace DNA buněk a zánět.

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli ve vzniku a rozvoji kolorektálního karcinomu. Mikroorganismy ovlivňují mikroprostředí střeva. Mohou podporovat zánětlivou reakci či produkovat různé toxiny. Cyklomodulační látky, které některé bakterie produkují, ovlivňují buněčný cyklus.

V diplomové práci byl zjišťován vztah mezi přítomností genů pro cyklomoduliny v genomu jednotlivých kmenů bakterie *Escherichia coli* a jejich genotoxickými vlastnostmi. Využit byl *in vitro* model pro zjištění přímého vlivu bakterií na buňky. Jako modelový mikroorganismus byla zvolena *E. coli*, která je běžnou součástí střevní mikrobioty a zároveň je fakultativně anaerobní, čímž je snadno kultivovatelná. Vybráno bylo šest kmenů, které mají různý vztah k hostiteli. Některé kmeny jsou probiotické, jiné komenzální a některé patogenní.

U probiotických kmenů *E. coli* (Nissle 1917 a O83) bylo detekováno méně genů pro cyklomoduliny než u ostatních testovaných kmenů. Výrazné rozdíly v genotoxických vlastnostech nebyly pozorovány. Rozdíly v působení jednotlivých kmenů *E. coli* na životnost a proliferaci buněk či aktivaci jejich reparačních mechanismů nebo fosforylaci proteinu p53 nebyly zaznamenány. Mírné rozdíly byly detekovány v produkci prozánětlivých cytokinů imunitními buňkami (myší makrofágová linie RAW 264.7) a porušení vrstvy epitelových buněk v závislosti na stimulaci rozdílnými kmeny *E. coli*.

Celkově nebyly prokázány signifikantní rozdíly v genotoxických vlastnostech jednotlivých kmenů *E. coli*.

Klíčová slova: tumorigeneze, kolorektální karcinom, střevní mikrobiota, *Escherichia coli*, cyklomoduliny

Abstract

Colorectal carcinoma is a severe disease of colon. It belongs to the cancers with the highest incidence and also high mortality. In the process of tumorigenesis, there are applied various mechanisms, mainly DNA damage and subsequent reparation and inflammation.

Gut microbiota plays an important role in development of the colorectal cancer influencing cancer microenvironment. Microbiota triggers inflammatory response or produces different toxins.

The diploma thesis was aimed on the relation between the presence of cyclomodulin genes in the genome of individual strains of bacterium *Escherichia coli* and their genotoxic features. To follow direct influence of epithelial cells by microbiota, we used *in vitro* model. We chose *E. coli* as a model microorganism because it is common bacterium of human gut, moreover, as facultative anaerob it is easily cultivated. We used six strains of *E. coli* with different relation to the host organism including probiotic, comensal and pathobiont.

In probiotic strains of *E. coli* (Nissle 1917 and O83), we detected less genes for cyclomodulins than in other strains. We did not observed significant differences in genotoxic features of the strains. Also, we did not detect any changes in viability, proliferation, activation of repair mechanisms or p53 fosforylation caused by different strains of *E. coli*. We observed minor differences in the inflammatory cytokine production by immune cells and in the epithelial layer damage after cultivation with different strains of *E. coli*.

In conclusion, we did not observed significant differences in genotoxic features of individual strains of *E. coli*.

Key words: tumorigenesis, colorectal carcinoma, gut microbiota, *Escherichia coli*, cyclomodulins

Obsah

Abstrakt	3
Seznam zkratk	7
1. Úvod	9
2. Přehled literatury	10
2.1. Kolorektální karcinom (CRC)	10
2.2. Tumorigeneze CRC	11
2.3. Střevní bariéra	14
2.4. Slizniční imunita	15
2.5. Střevní mikrobiota	17
2.5.1. Základní vztahy mezi mikroby a hostitelem	17
2.5.2. <i>Escherichia coli</i>	18
2.6. Role střevní mikrobioty v tumorigenezi CRC	19
2.7. Cyklomoduliny	19
3. Cíle práce	21
4. Materiál a metodika	22
4.1. Buněčné linie	22
4.1.1. Kultivace buněčných linií	22
4.1.1.1. Média	22
4.1.1.2. Pasážování	23
4.1.1.3. Rozmrazování a zamrazování buněk	23
4.1.1.4. Počítání buněk	24
4.2. Bakterie	24
4.2.1. Kmeny <i>E. coli</i>	24
4.2.2. Kultivace bakterií	25
4.2.2.1. Zamrazování bakterií	25
4.2.3. Zpracovávání bakterií	26
4.2.3.1. Měření optické hustoty bakteriální kultury	26
4.2.3.2. Odebrání bakteriálních supernatantů	26
4.2.3.3. Zamrazování bakterií pro izolaci DNA	26
4.2.3.4. Inaktivace bakterií formaldehydem	26
4.2.3.5. French press a lyofilizace	27

4.2.3.6. Stanovení obsahu proteinů	27
4.3. Detekce přítomnosti genů pro cyklo moduliny u jednotlivých kmenů <i>E. coli</i>	29
4.3.1. Izolace DNA	29
4.3.2. Měření koncentrace a čistoty DNA	30
4.3.3. PCR	30
4.3.4. Elektroforéza	32
4.4. Detekce životnosti, reparace poškození DNA, proliferace a fosforylace p53	33
4.4.1. Kultivace Caco-2 buněk s bakteriálními složkami a etoposidem	33
4.4.2. Konfokální mikroskopie	33
4.4.3. Kultivace buněčných linií s bakteriálními složkami a etoposidem	35
4.4.4. Průtoková cytometrie	35
4.5. Porovnání produkce prozánětlivých cytokinů buňkami v závislosti na kultivaci ..	38
4.5.1. ELISA	39
4.5.1.1. Použité roztoky	41
4.6. Detekce vlivu živých bakterií na porušení vrstvy epitelových buněk	42
4.6.1. Kultivace Caco-2 buněk s živými bakteriemi	42
4.6.2. Průtoková cytometrie	42
4.7. Seznam použitých protilátek	44
4.8. Statistické vyhodnocení	44
5. Výsledky	45
5.1. Detekce genů pro cyklo moduliny u jednotlivých kmenů <i>E. coli</i>	45
5.2. Porovnání vlivu kultivace buněk se složkami <i>E. coli</i> a etoposidem na životnost, produkci a reparaci DSB, proliferaci a na fosforylaci p53	49
5.2.1. Hodnocení vlivu na životnost	49
5.2.2. Hodnocení vlivu na aktivaci reparačních mechanismů	51
5.2.3. Hodnocení vlivu na proliferaci	54
5.2.4. Hodnocení vlivu na fosforylaci p53	55
5.3. Porovnání vlivu kultivace buněk se složkami <i>E. coli</i> a etoposidem na produkci prozánětlivých cytokinů	56
5.4. Porušení epitelové vrstvy živými bakteriemi	62
6. Diskuze	64
7. Závěr	67
Přehled citací	68

Seznam zkratek

Ab	protilátka
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3 related kinase
BCA	kyselina bicinchoninová
bp	páry bází
BSA	bovinní sérový albumin
c AB	navazovací (capture) Ab
CDT	cytolethal distending toxins
Chk1/2	checkpoint kináza 1/2
CIF	cycle-inhibiting factor
CNF	cytotoxic necrotizing factors
CRC	kolorektální karcinom
d AB	detekční Ab
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DC	dendritické buňky
dH ₂ O	destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouvláknové zlomy v DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	fetale bovine serum
FVD	Fixable viability Dye ®
GALT	střevní imunitní systém
H2A.X	forma histonu H2A
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HRP	křenová peroxidáza
IL	interleukin
LB médium	lysogeny broth médium
LPS	lipopolysacharid

MBÚ	Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR
MRN komplex	komplex, který se skládá z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1
OD	optická denzita
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFA	paraformaldehyd
RT	pokojová teplota
STR	streptavidin
TAE pufr	pufr obsahující tris(hydroxymethyl)aminomethan, kyselinu octovou a kyselinu ethylendiamintetraoctovou
TE pufr	pufr obsahující tris(hydroxymethyl)aminomethan a kyselinu ethylendiamintetraoctovou
TMB	tetrametylbenzidin
TNF	tumor necrosis factor
ÚMG	Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR
UV	ultrafialové světlo
γ H2A.X	fosforylovaná forma histonu H2A.X

1. Úvod

Kolorektální karcinom (rakovina tlustého střeva a konečníku) je velice závažné onemocnění. V České republice postihuje ročně několik tisíc a celosvětově přes milion lidí. Zároveň má poměrně hodně vysokou mortalitu. Proto je hledání vhodné léčby či způsobů přispívajících k potlačení onemocnění velmi aktuálním tématem.

Střevní sliznice přichází do kontaktu s velkým množstvím rozmanitých složek z potravy, trávicími šťávami, enzymy i množstvím mikroorganismů. Pro mikroorganismy je prostředí střeva dobrou nikou. Běžně se ve střevě vyskytují různé viry, houby, prvoci a až tisíc různých druhů bakterií. Toto složité společenstvo obsahuje jak pro organismus prospěšné, tak potenciálně patogenní mikroby. Celý systém mikroorganismů ovlivňuje střevo a může chránit před nemocemi, ale zároveň při porušení rovnováhy mezi prospěšnými a patogenními mikroorganismy může docházet k rozvoji řady onemocnění, jako jsou záněty, nádory či alergie.

Ač se téma vztahu střevní mikrobioty k rozvoji různých nemocí intenzivně zkoumá, stále zůstává mnoho vztahů a mechanismů neobjasněno.

V diplomové práci jsem se snažila objasnit roli bakterie *E. coli*, která je běžnou součástí střevní mikroflóry a zároveň její jednotlivé kmeny mají různý vztah k hostiteli, v tumorigenezi kolorektálního karcinomu.

2. Přehled literatury

2.1. Kolorektální karcinom (CRC)

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější nádory a jeho incidence se neustále zvyšuje. V celosvětovém měřítku se jedná u mužů o třetí nejběžnější diagnostikovaný nádor, u žen zaujímá dokonce druhou pozici. Ročně se celosvětově diagnostikuje přibližně 1 360 000 nových případů. Zároveň CRC patří i mezi nádory s nejvyšší úmrtností (GLOBOCAN projekt, 2012). Česká republika patří mezi země s nejvyšší incidencí CRC. Od roku 2000 incidence kolísá v rozmezí od 75 do 80 nově diagnostikovaných případů na 100 000 obyvatel (SVOD – Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR - databáze Národního onkologického registru).

V případě kolorektálního karcinomu se jedná většinou o sporadický výskyt. Přibližně 20 – 30 % nádorů kolorekta vykazuje dědičný výskyt a asi 5 % CRC je spojeno se známými dědičnými syndromy (Rustgi 2007, Jaspersen et al. 2010, Valle 2014). Sporadické nádory vznikají na základě náhodných mutací v DNA buněk a epigenetických změn. Mutace mohou postihovat různé geny. V případě CRC bývá počáteční mutace nejčastěji v tumor supresorovém genu APC, což vede k tvorbě benigních polypů. Asi v 15 % případů je mutace v genu APC následována dalšími mutacemi a rozvojem polypů v maligní karcinomy. Hereditární nádory kolorekta se klasifikují do dvou skupin, podle toho, jestli tvoří nebo netvoří polypy. Nejběžnější z onemocnění tvořících polypy je familiární adenomatózní polypóza. V případě nepolypózních dědičných CRC bývá mutace v reparačních mechanismech, především v mutátorových genech. Mezi nejčastější patří Lynchův syndrom (Mármol et al. 2017).

Na vznik a rozvoj CRC má vliv i mnoho vnějších faktorů. Některé mohou být ovlivnitelné, jiné nikoliv. Jedním z nejvýznamnějších je věk. Riziko vzniku CRC se s věkem zvyšuje. Sporadický CRC se nejčastěji objevuje u lidí nad 50 let (Das et al. 2017, Amersi et al. 2005). Hereditární nádory se obvykle projevují už v nižším věku (Jaspersen et al. 2010). Rizikovým faktorem je také předchozí výskyt u jedince, případně pozitivní rodinná anamnéza na výskyt CRC nebo zánětlivých střevních onemocnění (ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba). Dalším faktorem, který ovlivňuje rozvoj nádoru, je životní styl. Obezita, kouření a nadměrné pití alkoholu zvyšují pravděpodobnost výskytu, naopak dostatek pohybu a zdravá

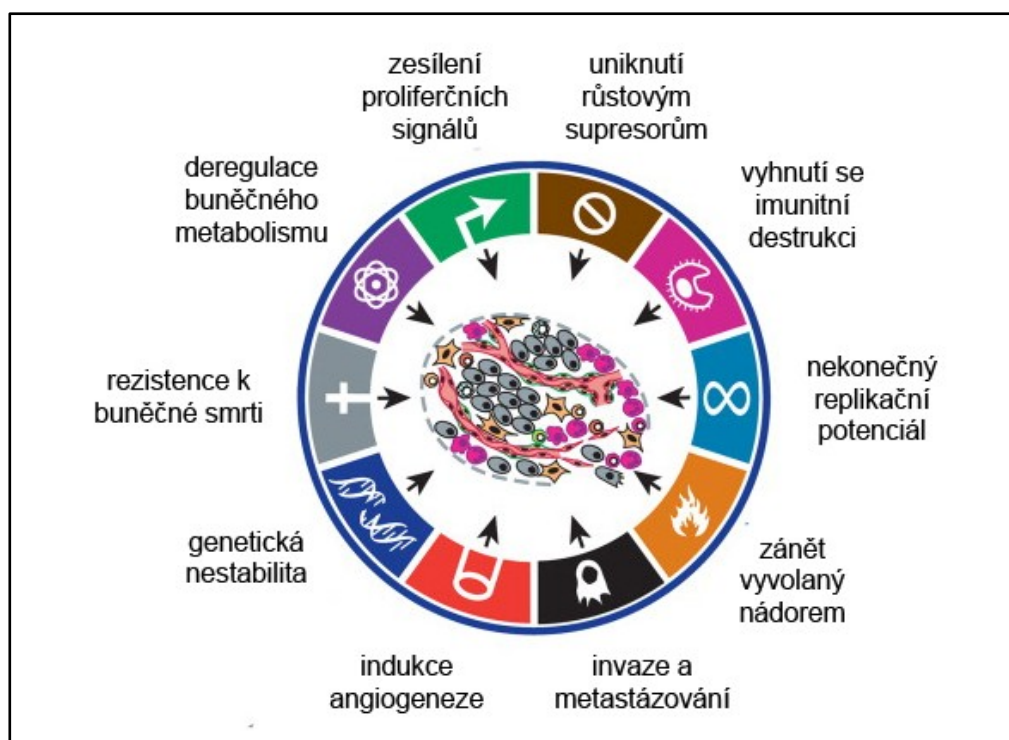
strava riziko onemocnění snižují (Das et al. 2017, Beets et al. 2017, Hagggar a Boushey 2009). Na rozvoj CRC má také vliv složení střevní mikrobioty (García-Castillo et al. 2016, Tözün et al. 2016).

2.2. Tumorigeneze CRC

Vznik nádoru je složitý proces, na kterém se podílí řada faktorů a mechanismů. Je výsledkem genetických mutací a faktorů vnějšího prostředí.

Nádorově transformované buňky ztrácí svůj tvar a funkci. Dochází u nich k selhání buněčného cyklu a apoptózy. Pro rozvoj nádoru jsou zároveň zásadní dvě podmínky a to genetická nestabilita buňky a zánět (Hanahan a Weinberg 2011).

Nádory vykazují celou řadu charakteristických znaků (obrázek č. 1). Mezi hlavní charakteristiky patří zvýšená odpověď na růstové signály a naopak snížená senzitivita k růstovým supresorům, neomezený replikační potenciál a resistance k apoptóze, později také indukce angiogeneze či invaze okolních tkání a tvorba metastáz (Hanahan a Weinberg 2000). Dalšími znaky jsou deregulace buněčného metabolismu a zamezení destrukce nádoru imunitním systémem těla (Hanahan a Weinberg 2011).



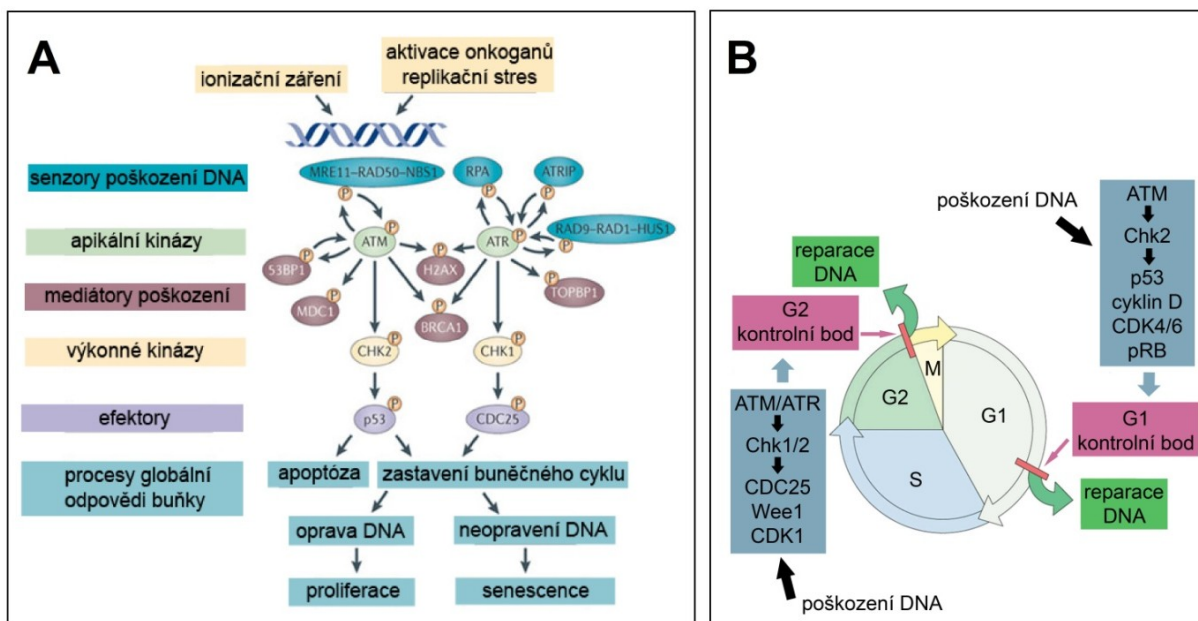
Obrázek č. 1: Základní znaky nádoru. (převzato a upraveno z článku Hanahan a Weinberg 2011)

Základním znakem nádorů je genetická nestabilita. Mechanismy vedoucí k této nestabilitě mohou být rozděleny do tří základních typů – chromozomová (CIN), mikrosatelitní (MSI) a epigenetická (CIMP) nestabilita (Mármol et al. 2017, Pancioni et al. 2012). Chromozomová nestabilita je nejčastějším typem nestability. Je spojena s mutacemi v onkogenech a tumor supresorových genech. Tyto změny vedou k přestavbám chromozomů, aneuploidiím nebo ke ztrátě heterozygoty (Pino a Chung 2010). Nestabilita mikrosatelitů je důsledkem defektů v DNA mismatch repair (MMR) systému. Chyby v replikaci repetitivních sekvencí (např. mikrosatelity) vedou ke vzniku bodových mutací, posunu čtecího rámce či nonsense mutacím (Boland a Goel 2010). Dalším typickým znakem CRC je epigenetická nestabilita, která vede k metylaci CpG ostrůvků (Lao a Grady 2011).

Chromozomová nestabilita může mít mnoho projevů. V buňce se mohou vyskytnout různé typy mutací – postihující jeden či více genů, větší chromozomové přestavby, ztráty nebo duplikace chromozomů nebo i celogenomové poruchy. Mezi nejnebezpečnější somatické mutace patří dvouvláknové zlomy DNA, protože mohou vést k chromozomovým přestavbám, ke ztrátě části genetické informace během buněčného dělení a genomové nestabilitě. Buňka reaguje na toto poškození spuštěním specifické odpovědi (DNA damage response, DDR), která zahrnuje upregulaci či aktivaci genů účastnících se v opravách DNA, toleranci poškození, aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, apoptózu či senescenci (Martin et al. 2016).

Poškození v DNA může být opraveno několika mechanismy, které zahrnují homologní rekombinaci, nehomologní ligaci konců, i některé méně běžné mechanismy jako single-strand annealing nebo alternativní ligaci konců (Mladenov et al. 2016).

V případě homologní rekombinace je dvouvláknový zlom DNA rozpoznán komplexem MRN, který se skládá z proteinů Mre11, Rad50 a Nbs1 (u savčích buněk) (Mladenov et al. 2016). MRN komplex váže a aktivuje ATM (ataxia telangiectasia mutated) kinázu, která následně fosforyluje histon H2A.X na serinu 139. H2A.X je forma histonu z rodiny H2A, který je součástí oktameru v nukleosomu (Kuo a Yang 2008). Po fosforylaci se označuje γ H2A.X a může sloužit jako marker poškození DNA a aktivace reparačních mechanismů v buňce (Martin et al. 2016). ATM kináza dále aktivuje Chk2 (checkpoint kináza 2), která působí na efektorové proteiny (například transkripční faktor p53 nebo fosfatáza CDC25). Tyto efektorové proteiny zajišťují globální odpověď buňky (obrázek 2. a) – opravy DNA, regulaci genové exprese, zastavení buněčného cyklu, apoptózu a další (Gagnaire et al. 2017). Pokud se buňka nachází v S nebo G2 fázi buněčného cyklu, může být spuštěna i alternativní dráha odpovědi na poškození vedoucí přes ATR kinázu a Chk1 (obrázek 2. b).



Obrázek č. 2: Schéma DDR. a) Přehled hlavních drah v dráze DDR. b) Přehled spuštění drah DDR v závislosti na fázi buněčného cyklu. (převzato a upraveno podle článků Hein et al. 2014, Sulli et al. 2012)

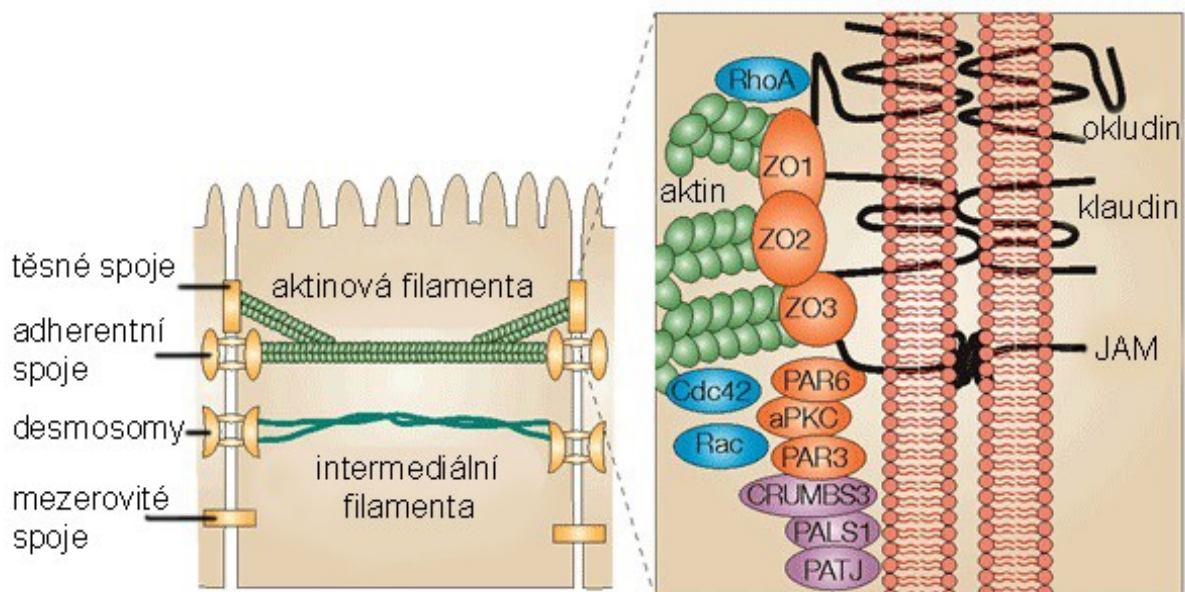
Riziko vzniku CRC zvyšuje také chronický zánět. Poškození střevní sliznice může vyvolat chronickou imunitní reakci vedoucí v buněčnou proliferaci a regeneraci. Důležitou roli během zánětu hrají makrofágy, které produkují prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-12) a reaktivní formy dusíku či kyslíku. Epitelové a endotelové buňky následně produkují zánětlivé mediátory, které způsobují atrakci neutrofilů do místa zánětu. Makrofágy a neutrofilové mohou působit poškození DNA pomocí produkce reaktivních forem kyslíku. Zánětlivé cytokiny stimulují proliferaci kmenových buněk. Dochází k defektům apoptózy, a akumulaci transformovaných buněk (Mariani et al. 2014).

Znaky zánětu asociovaného s nádory jsou infiltrace leukocytů, přítomnost prozánětlivých cytokinů (např. TNF, IL-1, IL-6 nebo chemokin IL-8), remodelace tkáně a angiogeneze. Prozánětlivé cytokiny mohou výrazně ovlivnit mikroprostředí nádoru. IL-6 má růstový a antiapoptotický efekt na buňku. TNF- α má vliv především na růst a invazivitu nádoru, angiogenezi či přilákání leukocytů do místa zánětu (příp. nádoru). Při dlouhodobém zánětu dochází také k aktivaci specifické imunity (Collota et al. 2009).

2.3. Střevní bariéra

Hlavními funkcemi střeva jsou trávení a vstřebávání živin z potravy, vstřebávání vody a transport iontů. Během těchto procesů dochází ke kontaktu střevní sliznice s obrovským množstvím složek potravy, s mikroorganismy i s vlastními trávicími enzymy. Střevní sliznice musí být proti nim odolná, musí zajistit mechanickou, antigenní i enzymatickou rezistenci, a zároveň musí zajistit integritu vnitřního prostředí organismu bez ovlivnění resorpce (König et al. 2016). Na udržení střevní bariéry se podílí celá řada mechanismů. Selektivní propustnost je zajištěna souhrnem mechanických a chemických mechanismů, které interagují s mikrobiální a imunitní složkou (Guarner a Malagelade 2003).

Střevní sliznice je tvořena jednovrstevným epitelem. Polarizované epitelové buňky jsou spolu pevně propojeny, čímž utváří celistvou mechanickou bariéru, která znemožňuje nekontrolovaný průchod mikroorganismů a transport látek paracelulární cestou (Groschwitz a Hogan, 2009). Toto propojení je tvořeno těsnými, adherentními a mezerovými spoji či desmozomy. Nejzásadnější pro udržení střevní bariéry jsou těsné spoje. Na jejich tvorbě se podílí řada proteinů. Membránové proteiny tvořící vlastní spoj (klaudin, okludin, JAM) jsou napojeny na intracelulární proteiny (zonulin ZO1 – ZO3), které zajišťují propojení s cytoskeletem buňky (obrázek č. 3). Propustnost bariéry může být regulována právě díky roztažitelnosti cytoskeletu (Choi et al. 2017).



Obrázek č. 3: Přehled jednotlivých typů spojů mezi enterocyty a podrobný pohled na strukturu těsných spojů. (převzato a upraveno z článku Aktories a Barbieri 2005)

Střevní epitel je tvořen několika buněčnými typy. Všechny jsou odvozeny z kmenových buněk, které se nacházejí v kryptách střeva. Největší podíl epitelových buněk zaujímají enterocyty. Ty zajišťují vlastní vstřebávání živin. Jejich apikální strana je tvořena mikrokly, které zvětšují jejich povrch. Dalšími buněčnými typy střevní sliznice jsou pohárkové buňky, jejichž funkcí je vylučování mucinů, a enteroendokrinní buňky, které produkují některé hormony. Tyto buňky se podílí na tvorbě hlenu (muciny jsou jeho hlavní složkou), který zajišťuje chemickou bariéru. Panethovy buňky hrají roli v ochraně kmenových buněk a v přirozené imunitě. Produkují antimikrobiální peptidy – defenziny, lysozomy či fosfolypázu A. Také produkují prozánětlivý a prokarcinogenní cytokin TNF- α . Součástí střevní sliznice je i řada imunitních buněk (viz níže).

2.4. Slizniční imunita

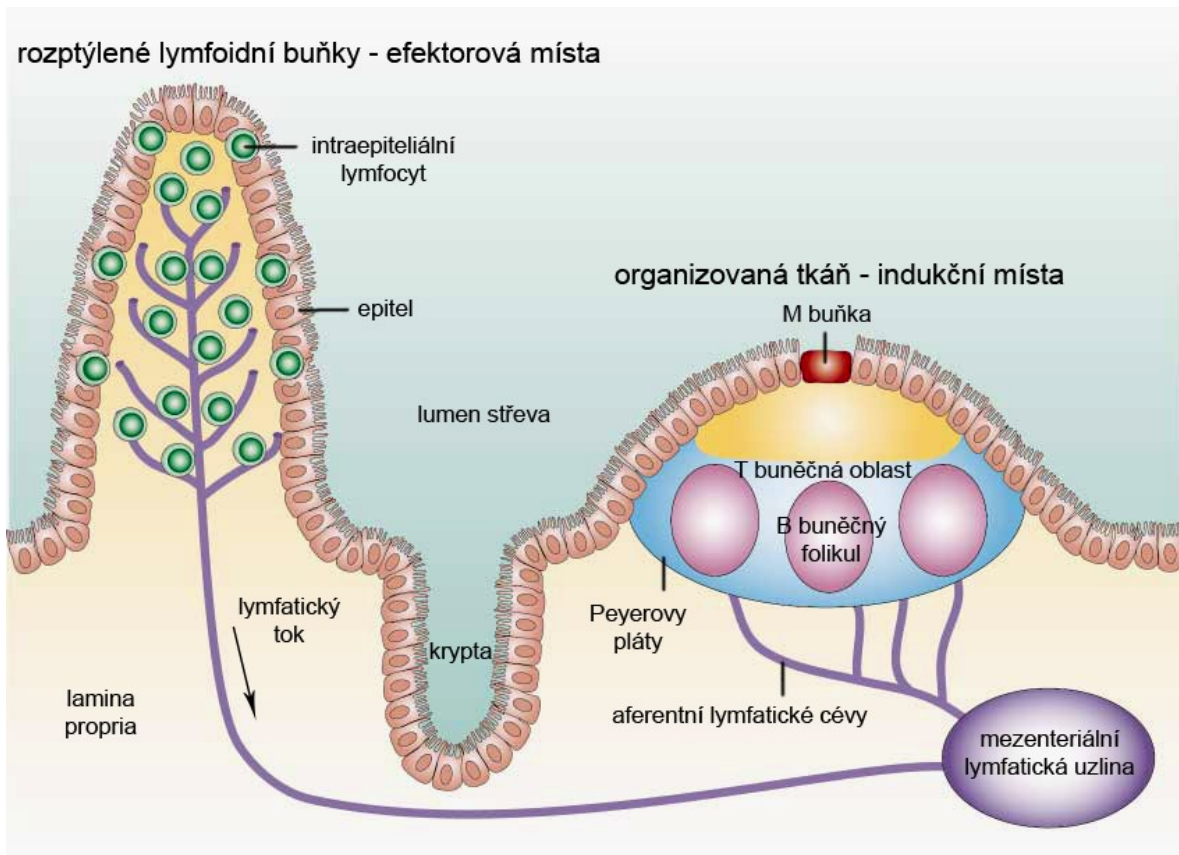
V obranyschopnosti střeva hraje důležitou roli střevní imunitní systém (GALT). Ten se setkává s obrovským množstvím antigenů. Pro správnou funkci je důležité nastolení rovnováhy mezi imunitní odpovědí a tolerancí. Nerovnováha může vést k translokaci mikrobů a infekci (při nedostatečné odpovědi na patogena) nebo na druhé straně k alergiím či zánětům (při hypersenzitivní odpovědi). Ve střevě probíhá stejně jako v jiných částech těla řada imunitních mechanismů, na kterých se podílí přirozená i adaptivní složka imunity. GALT je součástí složitého komplexu slizničního imunitního systému (McGhee a Fujihashi 2012).

GALT je funkčně rozdělen do dvou částí – indukční, která je tvořena organizovanými strukturami (Peyerovy pláty a mezenteriální lymfatické uzliny) a efektorová, kterou představují jednotlivé lymfocyty rozptýlené v epitelu a v lamina propria (obrázek č. 4) (Mowat 2003).

Imunitní reakce začíná v indukční části. Zde je antigen přenášen z lumen střeva a prezentován naivním T a B lymfocytům. Transport antigenu z povrchu sliznice zajišťují transcytózou M buňky, které se nachází v epitelové vrstvě kryjící Peyerovy pláty či izolované lymfatické uzliny (tzv. epitel asociovaný s folikuly). K M buňkám těsně nasedají dendritické buňky, které zajišťují zpracování a prezentaci antigenu (Ohno 2016, Brandtzaeg 2008).

Peyerovy pláty se skládají z folikulů (tvořených převážně B lymfocyty a folikulárními DC) a T lymfocytů. Prezentace antigenu dendritickými buňkami naivním lymfocytům způsobuje vznik efektorových T lymfocytů, které produkují cytokiny, a indukuje izotypový přesmyk B lymfocytů, což vede k produkci sekrečního IgA.

T i B lymfocyty se mění na efektorové či paměťové, migrují do lamina propria a některé CD8⁺ T lymfocyty i do epitelové vrstvy. B lymfocyty se vyvíjí v plazmocyty a jejich úlohou je produkce sekrečního IgA. Efektorové T lymfocyty produkují cytokiny, pomáhají plazmocyům v produkci IgA a regulují imunitní odpověď. Jsou odpovědné za lokální toleranci některých antigenů (Mowat 2003).



Obrázek č. 4: Anatomie střevní imunitní odpovědi. (převzato a upraveno z článku Mowat 2003)

2.5. Střevní mikrobiota

Střevní mikrobiota (dříve označovaná jako mikroflóra) je souhrn všech mikrobů obývajících střeva. Mikrobiota je složená převážně z bakterií, ale zahrnuje také viry, houby či prvoky. Mikroorganismy obývají místa lidského těla, která pro ně představují vhodné podmínky. Osidlují povrch těla (kůži) i tělní sliznice (urogenitální trakt, dýchací cesty, gastrointestinální trakt) a vytváří komplexní ekosystémy. Právě v gastrointestinálním traktu se vyskytuje největší množství mikroorganismů. Ve střevech člověka je obsaženo přibližně $3,9 \times 10^{13}$ mikroorganismů, což je téměř stejný počet jako všech buněk těla (Sender et al. 2016). Součástí střevní mikroflóry bývá u jedince přibližně 500 – 1000 druhů bakterií patřících do asi 10 bakteriálních kmenů (Xu a Gordon 2003, Camp et al. 2009).

Složení mikrobioty se liší v jednotlivých částech trávicího traktu a také se vyvíjí během života člověka. Je ovlivněno jak genetickými (Benson et al. 2010), tak především enviromentálními faktory jako životním stylem člověka, stravou či léčbou (Mármol et al. 2017). Zastoupení bakterií se také liší mezi jedinci, přesné složení střevní mikrobioty je individuální, přesto je u zdravých dospělých zastoupení hlavních skupin mikroorganismů podobné, což je dáno specifiky prostředí. Nejvíce všech střevních bakterií jsou zástupci kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (Davenport et al. 2014, Arumugam et al. 2011).

V trávicí soustavě převažuje zastoupení striktně anaerobních bakterií, přesto se ve střevě vyskytují i některé fakultativně anaerobní (Quigley 2013).

2.5.1. Základní vztahy mezi mikroby a hostitelem

Bakterie obývající trávicí trakt člověka mohou mít ke svému hostiteli různý vztah. Většina bakterií má vzhledem ke svému hostiteli komenzální vztah, což znamená, že bakterie mají ze soužití s hostitelem prospěch, ale zároveň svému hostiteli nevadí.

Mikroorganismy ale plní ve střevně i řadu důležitých funkcí. Zásadně se podílí na tvorbě střevní bariéry, účastní se metabolismu, produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem a vitamíny, reagují s imunitním systémem a zamezují růstu patogenních bakterií (Guarner a Malagelade 2003). Takto prospěšný vztah je označován jako mutualistický.

Některé bakterie se dokonce používají jako probiotika. Jedná se o živé mikroorganismy, které mají prospěšný vliv na hostitelský organismus (Hill et al. 2014). Mohou pozitivně působit na střevní bariéru, stimulují imunitní systém a ovlivňují imunitní odpověď, hrají důležitou roli v prevenci zánětů či alergií (Zákostelská et al. 2011, Kich et al. 2016).

Dalšími bakteriemi, které se mohou vyskytnout v lidském těle, jsou patobionty. Jedná se o komenzální bakterie, které se ale vlivem změny podmínek mohou chovat jako patogeny. Patogeny jsou mikroorganismy, které mohou vyvolat onemocnění (Casadevall a Pirofski 2014).

Pro hostitelský organismus je důležitá rovnováha mezi jednotlivými skupinami bakterií. Pokud dojde k dysbióze (narušení složení střevní mikrobioty) a převáží patogenní mikroorganismy, může dojít k narušení integrity hostitele, imunitní reakci, rozvoji zánětu a k propuknutí onemocnění (Shawki a McCole 2017).

Hostitelský organismus se setkává s obrovským množstvím mikrobiálních antigenů, na které reaguje. Zároveň může být ovlivňován produkty těchto mikroorganismů. Některé z nich mohou být prokarcinogenní.

2.5.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, kmene Proteobacteria. Je to fakultativně anaerobní bakterie, která je běžnou součástí střevní mikrobioty teplokrevných živočichů včetně člověka.

Stejně jako jiné mikroorganismy, i *E. coli* se taxonomicky rozděluje na sérotypy podle antigenních vlastností. Hlavními antigenními strukturami jsou somatické O antigeny, což jsou povrchové lipopolysacharidy (DebRoy et al. 2011), kapsulární K antigeny a H antigeny flagelinu. Skupina *E. coli* se stejnými antigenními vlastnostmi se označuje jako kmen.

E. coli je v mnoha ohledech pro člověka prospěšná – např. se podílí na produkci vitamínu K. Existují ale i patogenní kmeny, které mohou vyvolávat onemocnění, a to jak intestinální (průjemy), tak i extraintestinální (choroby vylučovacího traktu, hnisavé infekce...). Některé typy *E. coli* jsou ve vztahu k člověku komenzální, nebo u nich alespoň zatím nebyl prokázán ani patogenní ani probiotický účinek. Proto je právě *E. coli* vhodným modelem pro zkoumání různého vlivu bakterií na střevní mikroprostředí.

2.6. Role střevní mikrobioty v tumorigenezi CRC

Vznik a rozvoj kolorektálního karcinomu je ovlivněn řadou faktorů, genetických i environmentálních. Jedním z faktorů hrajícím roli v patogenezi střevních nádorů je složení mikrobioty. Zatímco viry mohou vyvolat vznik nádoru pomocí ovlivnění genetických mechanismů buňky, bakterie většinou přispívají k rozvoji nádoru díky poškození epitelu střeva, narušení střevní bariéry a vyvoláním zánětu (Schwabe a Jobin 2013). Některé bakterie také aktivují prokarcinogeny nebo produkují genotoxické nebo cyklomodulační látky, které působí na buňky hostitele. Genotoxiny způsobují poškození DNA a cyklomoduliny ovlivňují buněčný cyklus (Gagnière et al. 2016, Oswald et al. 2005).

Většina prací prokazujících vliv mikrobioty na vznik CRC byla dělána na zvířecích modelech. Výhodou je možnost použití bezmikrobních zvířat, která mohou být kolonizována přesně danými mikroorganismy. Pak se dá zkoumat rozdílnost vzniku a rozvoje nádorů *in vivo* mezi zvířaty, která se liší pouze spektrem střevních mikroorganismů (Klimešová et al. 2013).

Byly identifikovány některé bakterie, které se ve zvýšené míře vyskytují v nádorech kolorekta. U většiny z nich ale zůstává otázkou, jestli jejich primární přítomnost přímo vede ke karcinogenezi nebo se na nádorové tkáni usídlili až sekundárně. Mezi mikroorganismy asociované s CRC patří anaerobní gram-negativní fusobakterie, které ovlivňují imunitní reakci v místě vzniku nádoru. Suprimují T-buněčnou imunitní odpověď a zároveň mohou vyvolávat zánět stimulací produkce prozánětlivých cytokinů (Nosho et al. 2016, Mármol et al. 2017).

V patogenezi CRC stejně jako v případě některých chronických střevních zánětů hraje roli také *Escherichia coli*. Většina patogenních kmenů patří do fylogenetických skupin B2 nebo D (Cuevas-Ramos et al. 2010). Byly publikovány některé práce, které poukazují na rozdíly v zastoupení některých kmenů *E. coli* mezi pacienty s CRC a zdravými kontrolami (Arthur et al. 2012, Dalmaso et al. 2014). Některé *E. coli* produkují cyklomodulační látky.

2.7. Cyklomoduliny

O bakterii *E. coli* je známo, že může produkovat 4 skupiny cyklomodulinů – CNF (cytotoxic necrotizing factor), CIF (cycle-inhibiting factor), CDT (cytolethal distending factor) a kolibaktin (Dubois et al. 2010).

Toxiny ze skupiny CNF (CNF1 – CNF3) katalyzují deamidaci glutaminových zbytků regulačních eukaryotických GTPáz z rodiny Rho (Rho, Rac, and Cdc42), čímž způsobují jejich permanentní aktivaci (Fabbri et al. 2010). To může vést k ovlivnění genové exprese, poruchám signalizačních kaskád v buňce, změnám v buněčném cyklu a v konečném důsledku k nekontrolované proliferaci a přežívání buněk (Welch 2016).

CIF je efektorový protein, který blokuje buněčný cyklus (Marchès et al. 2003). CIF nemá genotoxický efekt, tudíž nezpůsobuje poškození DNA, ale zastavuje buněčný cyklus v kontrolních bodech nezávisle na poškození DNA (Hsu et al. 2008). Zabraňuje přechodu z G1 do S fáze nebo z G2 do M fáze v důsledku hromadění inhibitorů buněčného cyklu. Může také indukovat buněčnou smrt epitelových buněk (Samba-Louaka et al. 2009).

Faktory CDT jsou heterotrimerní proteiny produkováné mnoha patogenními bakteriemi. Mají genotoxický účinek, to znamená, že indukují dvouvláknové zlomy v DNA, což může vést k poruchám buněčného cyklu a apoptóze (Jinadasa et al. 2011). Buňky ovlivněné CDT vykazují pozastavení buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi na základě mechanismů reagujících na poškození DNA – aktivace ATM kinázy, fosforylace histonu H2A.X, aktivace tumor-supresoru p53. Zároveň buňky produkují různé prozánětlivé cytokiny – např. IL-6 nebo IL-8 (Blažková et al. 2010). CDT mohou hrát roli v tumorigenezi CRC právě v důsledku poškození DNA buněk (Graillot et al. 2016).

Kolibaktin je peptido-polyketidová struktura, která je produkována enzymy kódovanými genotoxickým ostrůvkem genů, nazývaným *pks*. Kolibaktin způsobuje poškození DNA, proto je zařazen také mezi genotoxiny. Buňka, která je ovlivněna kolibaktinem, neprochází kvůli poškození DNA buněčným cyklem a zastavuje se na rozhraní G2 a M fáze. Dochází k aktivaci kináz ATM a Chk2 (Nougayrede et al. 2006).

Producentem kolibaktinu jsou bakterie *E. coli* patřící do fylogenetické skupiny B2 (Gagnaire et al. 2017). *E. coli*, které produkují kolibaktin, jsou častější u pacientů s CRC nebo střevními záněty (Sears a Garrett 2014).

3. Cíle práce

Cílem diplomové práce je porovnat genotoxické vlastnosti různých kmenů bakterie *Escherichia coli* ve vztahu ke střevnímu epitelu a slizniční imunitě v *in vitro* podmínkách.

Jednotlivé kmeny *E. coli* mají různý vztah ke střevním onemocněním. Proto jsem zkoumala, jestli mohou mít různý efekt také na rozvoj střevních nádorů. Hlavním cílem bylo zavést *in vitro* model pro zkoumání vlivu bakterií na rozvoj CRC.

Jelikož genotoxicita bakterií souvisí s jejich genetickou výbavou, zjišťovala jsem nejprve, jestli vybrané kmeny *E. coli* obsahují geny pro cyklomoduliny. Dále jsem porovnávala vliv jednotlivých bakteriálních komponent na rozvoj nádoru a jejich imunogenicitu. Jako ukazatele pronádorových změn jsem využila aktivaci reparačních mechanismů po poškození DNA, proliferaci buněk a fosforylaci proteinu p53. Imunogenicitu jsem zkoumala vzhledem k potenciálu vyvolat zánět. Také jsem stanovovala schopnost živých bakterií porušit epitelovou vrstvu, což v organismu může vést k narušení střevní bariéry.

Konkrétní úkoly diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech.

- detekovat přítomnost genů kódujících cyklomoduliny v genomu jednotlivých kmenů bakterie *E. coli*
- porovnat vliv kultivace buněk se složkami (supernatant, lyzát, inaktivované bakterie) různých kmenů *E. coli* a etoposidem na životnost, vznik a reparaci dvouvláknových zlomů v DNA, proliferaci a na fosforylaci proteinu p53
- porovnat produkci prozánětlivých cytokinů buňkami v závislosti na kultivaci s bakteriálními složkami a etoposidem
- porovnat vliv živých bakterií na porušení vrstvy adherentních buněk a na jejich životnost

4. Materiál a metodika

4.1. Buněčné linie

Pro *in vitro* experimenty bylo v průběhu práce použito několik buněčných linií. Převážná část experimentů byla prováděna na buněčných liniích lidských epitelových buněk (Caco-2, HT-29). Caco-2 (ATCC® HTB-37) i HT-29 (ATCC® HTB-38) jsou nádorové buněčné linie získané z kolorektálního adenokarcinomu.

Pro některé experimenty byly použity také myší buňky, konkrétně linie myších makrofágů RAW 264.7 (ATCC® TIB-71), která byla získána z myši trpící leukemií způsobenou Abelsonovým virem myší leukemie.

Všechny použité buněčné linie jsou adherentní.

4.1.1. Kultivace buněčných linií

Buňky byly kultivovány v termostatu (Sanyo Electric CO) při teplotě 37°C, 95% vlhkosti a při 5% koncentraci CO₂. Veškerá práce s buněčnými liniemi během kultivace probíhala sterilně, manipulováno s nimi bylo v laminárním boxu Steril Antares 72 (Foester Wheeler division, Steril Factory). Také média a jiné přísady byly používány sterilní. Ke kultivaci buněk byly používány kultivační lahve o velikosti kultivační plochy 75 cm², do které bylo dáváno 10 ml média. Médium bylo podle potřeby měněno po 3-4 dnech.

4.1.1.1. Média

Pro kultivaci buněčných linií byla použita následující média.

- Pro Caco-2 a RAW 264.7 buňky:
 - DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, ÚMG)
 - + 10% FBS (Sigma-Aldrich)
 - + 1% směs antibiotik (penicilin + streptomycin, Sigma-Aldrich)*
 - + 1% glutamin (Sigma-Aldrich)
 - + 0,15% NaHCO₃ (ÚMG)
- *pro kultivaci s živými bakteriemi bylo použito médium bez antibiotik

- Pro HT-29 buňky:
 - DMEM (ÚMG)
 - + 10% FBS (Sigma-Aldrich)
 - + 1% směs antibiotik (penicilin + streptomycin, Sigma-Aldrich)
 - + 1% glutamin (Sigma-Aldrich)
 - + 1% směs neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich)

4.1.1.2. Pasážování

Buňky byly udržovány během kultivace v optimální koncentraci. U buněčných linií odvozených z epitelu nedocházelo k přerůstání buněk do více vrstev. Když byly buňky narostlé do vhodné koncentrace, byly pasážovány.

Buňky RAW 264.7 byly pasážovány každé 3 – 4 dny. Z kultivační lahve bylo odebráno staré médium a buňky byly opláchnuty fyziologickým roztokem. Poté byly buňky ze dna kultivační lahve seškrabány pomocí plastové škrabky a resuspendovány v čistém médiu. Zpět do kultivační lahve bylo nasazeno přibližně 5×10^5 buněk.

Epitelové buněčné linie byly pasážovány přibližně po 4-7 dnech v závislosti na hustotě buněk. Jako disociační roztok byl použit 0,25% roztok trypsinu v EDTA (ÚMG). Nejprve bylo odstraněno staré médium. Následně byla buněčná kultura opláchnuta sterilním fyziologickým roztokem (Ardeapharma) a poté byl přidán roztok trypsinu tak, aby pokryl dno (7 ml do kultivační lahve o ploše dna 75 cm^2), a buněčná kultura byla umístěna na 5-10 minut do 37°C . Po uvolnění buněk ze dna lahve do roztoku bylo působení trypsinu zastaveno přidáním dvojnásobného objemu média. Buněčná suspenze byla centrifugována (200 g, 5 minut, pokojová teplota). Supernatant byl odstraněn a buňky byly dvakrát promyty 10 ml média, aby došlo k důkladnému odstranění zbytků trypsinu. Nakonec byl supernatant odlit a peleta resuspendována v čistém médiu. Do nové kultivační lahve bylo nasazeno asi 10^6 buněk. Pro použití v dalších experimentech byla suspenze buněk upravena na požadovanou koncentraci.

4.1.1.3. Rozmrazování a zamrazování buněk

Buněčné linie byly uchovávány při teplotě -80°C v 5% roztoku kryoprotektiva DMSO v kryozkumavkách po 1 ml s obsahem asi 5×10^6 buněk. Rozmrazování buněk bylo prováděno co nejrychleji, zkumavka byla po vyndání z mrazáku ponořena do horké vody a ihned po

rozpuštění tekutiny byl obsah přepipetován do zkumavky s kultivačním médiem (10 ml). Zkumavka byla centrifugována (200 g, 5 min, pokojová teplota), supernatant odlit a peleta resuspendována v 10 ml nového média. Poté byla suspenze buněk nanesena do sterilní kultivační lahve.

Pro zamrazování buněk byla hustota suspenze buněk po pasážování upravena na koncentraci 1×10^7 buněk / ml a pomalu a důkladně promíchána v poměru 1:1 s 10% roztokem DMSO (Sigma-Aldrich) v médiu. Výsledná suspenze byla rozpipetována do zamrazovacích zkumavek po 1 ml (5×10^6 buněk a 5% roztok DMSO). Zkumavky byly dány na 20 minut do teploty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté umístěny do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.1.4. Počítání buněk

Počet živých buněk v suspenzi byl zjišťován metodou počítání v Bürkerově komůrce. Pro obarvení buněk byla použita trypanová modř (0,4% roztok, Sigma-Aldrich), díky níž bylo možné rozlišit živé buňky od mrtvých. Mrtvé buňky nebyly počítány, tudíž jsou všechny počty vztaženy na živé buňky. Počítala jsem vždy alespoň 20 čtverců (o velikosti $0,04\text{ mm}^2$ a hloubce $0,1\text{ mm}$), z nichž byly výsledky průměrovány. Výsledný počet buněk ve čtverci jsem převedla na počet buněk na 1 ml.

Koncentrace buněk byla dále upravována ředěním suspenze kultivačním médiem.

4.2. Bakterie

4.2.1. Kmeny *E. coli*

Pro experimenty bylo použito 6 různých kmenů bakterie *Escherichia coli* (Nissle 1917, K6, LF82, p19A, O83 a O6K13). *E. coli* Nissle 1917, LF82 a p19A patří do fylogenetické skupiny B2.

Kmen *E. coli* Nissle 1917 (sérotyp O6:K5:H1) byl popsán před sto lety profesorem A. Nissle. Jedná se o probiotický kmen používaný v klinické praxi k léčbě střevních zánětlivých onemocnění pod názvem Mutaflor®. Probiotické bakterie kompetují s jinými (patogenními) mikroorganismy a zároveň se podílí na metabolických procesech vedoucích ke zlepšení bariérové funkce střeva. U tohoto kmene nejsou známy žádné patogenní účinky (Sonnenborn 2009, Lukáš 2003).

Kmen O83 (konkrétně sérotyp O83:K24:H31) je také probiotický, používaný k prevenci střevních patologií u novorozenců pod názvem Colinfant New Born®. Testován je i ve spojení s prevencí vzniku alergií u dětí (Lodinová-Zádníková et al. 2010).

Dále byly použity patogenní kmeny *E. coli* LF82, p19A a O6K13.

LF82 je adherentně invazivní kmen (sérotyp O83:H1) spojený s rozvojem Crohnovy choroby. Byl izolován ze střevní léze pacienta trpícího Crohnovou chorobou a popsán v laboratoři prof. Darfeuille-Michaud v roce 1999 (Boudeau et al. 1999).

Kmen p19A hraje roli v rozvoji ulcerózní kolitidy. Ve svém genomu obsahuje gen *CNFI* (Mirsepasi-Lauridsen et al. 2016).

E. coli O6K13 je uropatogenní kmen (Hudcovic et al. 2007).

Posledním testovaným kmenem byl K6, u kterého není prokázána ani patogenní ani probiotická funkce.

4.2.2. Kultivace bakterií

Bakterie byly pěstovány v tekutém LB (lysogeny broth) médiu. Médium bylo připraveno rozpuštěním 20 g prášku LB média (Sigma-Aldrich) v 1 l destilované vody. Takto připravené médium bylo autoklavováno a dále s ním bylo pracováno ve sterilních podmínkách. Uchovávalo se v chladu (4 °C).

Bakterie byly uchovávány v kryozkumavkách v glycerolu při –80 °C. Z bakteriální konzervy jsem nasazovala 100 µl do 250 ml média. Kultivace probíhala 24 hodin na třepačce při 37 °C. Poté byly bakterie dále zpracovávány (viz níže).

4.2.2.1. Zamrazování bakterií

Z narostlé bakteriální kultury jsem připravila bakteriální konzervy. Bakterie byly zamrazovány v roztoku s glycerolem (Sigma-Aldrich), který slouží jako kryoprotektivum. Do kryozkumavky jsem dávala 150 µl glycerolu a 850 µl suspenze bakterií, směs jsem promíchala a zkumavky byly umístěny do –80 °C.

4.2.3. Zpracovávání bakterií

4.2.3.1. Měření optické denzity bakteriální kultury

V narostlé bakteriální kultuře jsem měřila optickou denzitu, která koreluje s hustotou a tedy i počtem bakterií. Pro měření byl použit spektrofotometr Ultrospec 10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Jako *blank* sloužilo čisté LB-médium. Optická denzita byla měřena při vlnové délce 600 nm.

Pokud jsem dále používala živé bakterie ke kultivaci s buňkami, naředila jsem kultury všech bakteriálních kmenů čistým LB médiem na stejnou optickou denzitu ($OD_{600} = 0,5$), což odpovídá počtu asi 6×10^8 buněk / ml.

4.2.3.2. Odebrání bakteriálních supernatantů

Pro následné experimenty byl z kultivace získáván bakteriální supernatant. Bakteriální kultura byla přepipetována do 50ml zkumavek a centrifugována (15 min, 3100 g, RT) a poté byl odebrán supernatant. Ten byl dále ještě filtrován přes filtr o velikosti pórů 0,22 μ m (Merck Millipore).

4.2.3.3. Zamrazování bakterií pro izolaci DNA

Peletu bakterií jsem poté resuspendovala ve 30 ml sterilního fyziologického roztoku. Od každého kmene *E. coli* jsem odebrala do mikrozkušavek po 1 ml suspenze. Zkušavky byly centrifugovány (15 min, 3100 g, RT), supernatant byl odlit a peleta byla zamražena (-80°C). Z těchto vzorků byla následně izolována bakteriální DNA.

4.2.3.4. Inaktivace bakterií formaldehydem

Část bakterií byla používána v inaktivovaném stavu. Inaktivace byla prováděna pomocí formaldehydu. Připravila jsem 1% roztok formaldehydu v PBS ze zásobního 37% roztoku (Sigma-Aldrich). 1 ml bakteriální kultury jsem propláchla fyziologickým roztokem a centrifugovala (15 min, 3100 g, RT). Supernatant jsem odlila a peletu jsem resuspendovala v 10 ml 1% formaldehydu. Suspenze byla ponechána 3 hodiny při pokojové teplotě, čímž došlo

k inaktivaci bakterií. Po inaktivaci byly bakterie 3x promyty sterilním PBS. Na závěr byly resuspendovány v 5 ml PBS a umístěny do chladu (4 °C) pro pozdější použití.

4.2.3.5. French press a lyofilizace

Z další části nakultivovaných bakterií byly vytvořeny lyzáty. K tomu bylo použito metody French Press, která spočívá v rozbití bakterií pomocí vysokého tlaku. Bakteriální suspenze jsem propláchla sterilním fyziologickým roztokem, následně destilovanou vodou a resuspendovala ve 12 ml destilované vody. Byl použit přístroj French press (SLM-AMINCO Spectronic Instruments). Principem tohoto přístroje je, že bakteriální suspenze je uzavřena do válce, na jeho jednom konci je umístěn píst a na druhém kohoutek. Na píst je působeno velkým tlakem (v mém případě 1500 kPa). Povoláním kohoutku dochází k pomalému odkapávání suspenze. Díky velkému rozdílu tlaků uvnitř a vně válce dojde k popraskání buněk. Pro každý vzorek byl postup zopakován 3x, aby došlo k lýze co největšího počtu bakterií. Mezi jednotlivými vzorky byly součásti přístroje opláchnuty etanolem a destilovanou vodou, aby bylo zajištěno minimální riziko kontaminace vzorků.

Následně byly rozbité bakterie lyofilizovány (sušeny za nízkého tlaku a teploty). Suspenze rozbitých bakterií byla rozpipetována po 1 ml do 2ml zkumavek, které byly otevřené umístěny do lyofilizátoru. Lyofilizace probíhala ve vakuu přibližně 5 - 6 hodin. Lyzáty byly poté uchovávány v -80°C . Před dalším použitím byly rozpuštěny v destilované vodě (500 μl) a přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 0,22 μm (Merck Millipore). Filtrované bakteriální lyzáty byly uchovávány při -80°C .

4.2.3.6. Stanovení obsahu proteinů

V bakteriálních supernatantech i v roztocích lyzovaných či inaktivovaných bakterií byl stanoven celkový obsah proteinů pomocí kolorimetrické metody, která je založena na redukci měďnatého iontu po reakci s peptidovou vazbou na měďný a jeho následné reakci s kyselinou bicinchoninovou (BCA), což je provázeno změnou barvy (Sapan et al. 1999).

Byl použit komerční kit Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Vzorky i standard byly ředěny destilovanou vodou. Jako standard sloužil roztok BSA, který jsem naředila na koncentrace od 2000 μg do 31,25 μg . Postupovala jsem podle postupu doporučeného výrobcem (protokol č. 1). Barevná změna byla měřena spektrofotometricky,

pomocí spektrofotometru Multiskan Ascent (Labsystems), při vlnové délce 530 nm. Z výsledků absorbance standardu byla vytvořena kalibrační křivka a podle ní jsem dopočítala koncentrace vzorků. Pro použití v následných pokusech jsem vzorky naředila tak, aby měly stejný obsah proteinů.

Protokol č. 1

- 1) do 96 jamkové destičky napipetovat po 10 μ l od každého vzorku i jednotlivých standardů (standards v dubletech)
- 2) přidat 200 μ l detekčního činidla
- 3) inkubovat 30 minut při 37 °C
- 4) změřit optickou denzitu při 530 nm

4.3. Detekce přítomnosti genů po cyklomoduliny u jednotlivých kmenů *E. coli*

U jednotlivých kmenů bakterie *E. coli* jsem zjišťovala přítomnost genů pro cyklomoduliny. Konkrétně jsem se zaměřila na geny *CNF1*, *CNF2*, *CNF3*, *CDT1*, *CDT2*, *CIF* a ostrůvek genů *pks*.

4.3.1. Izolace DNA

Na izolaci DNA jsem použila bakterie, které byly po kultivaci zamraženy v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izolaci DNA jsem prováděla pomocí komerčního kitu MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre). Postupovala jsem podle doporučeného protokolu (protokol č. 2).

Protokol č. 2

1. vzorky předem zvážit
2. vzorky umístit do lyzačních zkumavek se zirkonovými kuličkami
3. do každé lyzační zkumavky přidat 300 μl lyzačního roztoku a 1 μl proteinázy K
4. homogenizovat pomocí Fast Prep na maximální výkon 1 minutu
5. ihned přemístit na 10 minut do vyhřívacího bločku ($65\text{ }^{\circ}\text{C}$)
6. homogenizaci a zahřátí ještě 2x opakovat
7. centrifugovat (6 min, 4500 g, RT)
8. přepipetovat supernatant (asi 300 μl) do čisté mikrozkušavky
9. ke každému vzorku přidat 1 μl RNAzy A, promísit
10. inkubvat 30 min v inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), občas lehce promísit
11. centrifugovat (6 min, 4500 g, RT)
12. přepipetovat supernatant do čisté mikrozkušavky
13. přidat dle každému vzorku 14 μl TE pufru a 50 μl 2xT&c Lysis Solution
14. okamžitě umístit na led a inkubovat na ledu 5 min
15. přidat ke každému vzorku 100 μl MPC Protein Precipitation Reagent
16. vortexovat 15-20 sekund
17. centrifugovat (11 min, 20000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)
18. přepipetovat supernatant do čisté mikrozkušavky
19. přiat ke každému vzorku 200 μl isopropanolu
20. vzorky promísit (asi 40x převrátit)

21. centrifugovat (11 min, 20000 g, 4 °C)
22. odlít supernatant
23. 2x promýt 1000 µl 70% etanolu
24. odlít a odpipetovat veškerý etanol, nechat dosušit
25. resuspendovat v 35 µl TE pufru (jen jemně proklepat)

4.3.2. Měření koncentrace a čistoty DNA

Po izolaci DNA jsem zjišťovala její koncentraci a čistotu spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific). Měření jsem prováděla při vlnové délce 260 nm. Čistota DNA byla stanovena jako poměr měření při 260 nm a 280 nm (ukazatel znečištění proteiny) a poměr měření při 260 nm a 203 nm (ukazatel znečištění organickými látkami). Všechny měřené vzorky DNA splňovaly poměr absorbancí $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$ a $A_{260}/A_{230} \geq 1,6$.

Podle změřené koncentrace jsem si upravila od každého vzorku 200 µl na pracovní koncentraci 50 ng/µl.

Izolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -80 °C.

4.3.3. PCR

Ve vzorcích DNA izolovaných z jednotlivých kmenů *E. coli* jsem zjišťovala přítomnost některých genů pro cyklomoduliny.

Primery ohraničující konkrétní geny byly připraveny podle dřívějšího experimentu (Dubois et al. 2010). Abych zjistila, při jaké optimální teplotě nasedají na DNA, provedla jsem nejprve pro každou sadu primerů gradientovou PCR. Použila jsem rozpětí teplot nasedání primerů od 48 do 60 °C. Použila jsem DNA z patogenních kmenů *E. coli* (LF82, p19A a O6K13), které by měly alespoň některé ze sledovaných genů obsahovat (Mirsepasi-Lauridsen et al. 2016). Jako negativní kontrolu jsem použila při nejnižší teplotě vodu místo DNA. Vyzkoušela jsme všechny sady primerů, avšak při použití některých z nich jsem nezískala žádný produkt a některé produkovaly ještě další nespecifický produkt. Proto jsme si nakonec ještě sami navrhli další primery pro geny *CNF1* a *CNF2*. Seznam všech použitých primerů je uveden v tabulce č. 1.

Při přípravě gradientové PCR jsem postupovala dle protokolu č. 7. Pro samotnou PCR jsem použila cycler Tadvanced (Biometra).

Na základě výsledků z gradientové PCR jsem zvolila pro PCR s ostatními vzorky teploty pro nasedání primerů uvedené v tabulce č. 2. Jinak jsem postupovala podle stejného protokolu (protokol č. 3).

gen	primer	sekvence (5'-3')	T	velikost produktu (bp)
<i>pks</i>	pks – F	ATTCGATAGCGTCACCCAAC	58 °C	2119
	pks – R	TAAGCGTCTGGAATGCAGTG		
<i>CNF1</i>	CNF1 – F	GGGGGAAGTACAGAAGAATTA	49 °C	1112
	CNF1 – R	TTGCCGTCCACTCTCACCAGT		
	CNF1a – F	GTTAGGTCAGGGCCCACAGTCA	50 °C	411
	CNF1a – R	TTAGCGGCTTCAAATACGGATAG		
	CNF1b – F	GTTGAAGTACTGGCTGTGGTTGAC	50 °C	404
	CNF1b – R	TAAGTTGAGCCGAGTGAAGATGAG		
<i>CNF2</i>	CNF2 – F	TATCATACGGCAGGAGGAAGCACC	49 °C	1241
	CNF2 – R	GTCACAATAGACAATAATTTTCCG		
	CNF2a – F	ACGTCGTTCTGCTATCCCTGGTT	50 °C	460
	CNF2a – R	CTGGCGTTGGTTGCGGTAGTT		
<i>CNF3</i>	CNF3 – F	TAACGTAATTAGCAAAGA		757
	CNF3 – R	GTCTTCATTACTTACAGT		
<i>CIF</i>	CIF – F	AACAGATGGCAACAGACTGG	49 °C	383
	CIF – R	AGTCAATGCTTTATGCGTCAT		
<i>CDT1</i>	CDT1 – F	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG		467
	CDT1 – R	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA		
<i>CDT2</i>	CDT2 – F	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG		467
	CDT2 – R	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA		

Tabulka č. 1: Seznam primerů použitých pro PCR, T = teplota nasedání primerů

Protokol č. 3

1. všechny roztoky promíchat a krátce centrifugovat, držet je na ledu
2. připravit mix pro každou sadu primerů (pro $x+1$ reakcí, uvedené množství je pro jednu reakci)

voda (nuclease-free)	9,5 μ l
master mix Combi PPP (Top-Bio)	12,5 μ l
forward primer	1 μ l
reverse primer	1 μ l

3. do PCR destičky na ledu rozpipetovat DNA templát (nebo vodu jako kontrolu) po 1 μ l do jamky
4. rozpipetovat mix po 24 μ l na jamku
5. přelepit folií
6. krátce centrifugovat
7. vložit destičku do cycleru a nastavit PCR program

94 °C	3 min	} 35x
94 °C	30 s	
gradient od 48 do 60 °C	40 s	
72 °C	90 s	
72 °C	8 min	
4°C		

4.3.4. Elektroforéza

K separaci PCR produktů jsem používala gelovou elektroforézu. Ověřovala jsem, které geny byly u jednotlivých kmenů *E. coli* detekovány a jestli produkty PCR mají předpokládanou velikost. Připravila jsem si 2% agarózový gel. 2 g agarózy (Amresco) jsem rozpustila ve 100 ml TAE pufru (Omega Bio-teek, Inc.) a přidala jsem 10 μ l barviva SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Do každé jamky gelu jsem nanášela 5 μ l vzorku nebo DNA ladderu GeneRuler Express DNA Ladder (Thermo Scientific).

Elektroforéza probíhala přibližně 30 min při napětí 90 V. Gel byl vizualizován pomocí UV transluminátoru (Renner GMBH).

4.4. Detekce životnosti, reparace poškození DNA, proliferace a fosforylace p53

Zkoumala jsem, jaký mají vliv jednotlivé kmeny *E. coli* při kultivaci s buněčnými liniemi na životnost buněk, poškození DNA a aktivaci reparačních mechanismů, na proliferaci a na fosforylaci proteinu p53. Porovnávala jsem vliv různých složek z kultivace bakterií – supernatant z kultivace, bakteriální lyzáty a inaktivované bakterie. Také jsem porovnávala různé koncentrace těchto složek. Vliv bakterií jsem kombinovala s účinkem etoposidu, který jako cytostatikum vede k tvorbě DSB a tím poškozuje DNA.

4.4.1. Kultivace Caco-2 buněk s bakteriálními složkami a etoposidem

Poškození buněk a následná aktivace reparačních mechanismů byla vizualizována pomocí fluorescenčně značených protilátek a pozorována konfokálním mikroskopem.

Buněčná kultura (epitelové buněčné linie) byla nejprve nasazena do komůrek nalepených na podložních sklíčkách (Thermo Scientific) a 2-3 dny ponechána růst v termostatu (37 °C, při 95% vlhkosti a 5% koncentraci CO₂). Jamky na sklíčku mají stejnou velikost jako v 96 jamkové destičce. Bylo do nich dáváno 200 µl média a nasazováno 10 000 buněk.

Poté bylo odebráno médium a vyměněno za roztok lyzátů či supernatantů jednotlivých kmenů *E. coli* o koncentraci proteinů 50 ng/ml. Jako kontrola sloužilo čisté buněčné médium. Vzorky byly připraveny v dubletech. Sklíčka s buňkami byla opět umístěna do termostatu na 24 hodin. Na poslední hodinu kultivace byl vždy k jednomu ze vzorků z dubletu přidán etoposid (Sigma-Aldrich, o výsledné koncentraci 100 µM).

4.4.2. Konfokální mikroskopie

Po ukončení kultivace jsem odpipetovala médium a buňky byly barveny pro konfokální mikroskopii dle protokolu č. 4. Použila jsem barvení zonnulinu (kombinace primární králičí Ab anti-ZO-1 a sekundární protikráličí protilátky značené AlexaFluor® 488), díky němuž jsem vizualizovala buněčné spoje, barvení histonu γH2A.X (anti-γH2A.X AlexaFluor® 647), které vizualizovalo aktivaci reparačních mechanismů v závislosti na poškození DNA, a interkalační barvivo DAPI, které vizualizovalo buněčná jádra. Informace o protilátkách použitých k barvení jsou uvedeny v kapitole 4.7. Barvení probíhalo za pokojové teploty,

množství všech roztoků kromě protilátek bylo přidáváno přibližně do poloviny jamky. Po každém kroku barvení jsem odstranila supernatant.

Pozorování bylo prováděno ve Středisku cytometrie a mikroskopie MBÚ, pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FV-1000. Fotografie jsem zpracovávala pomocí programu Olympus Fluoview (FV10-ASW Viewer 2_0).

Protokol č. 4

- 1) opláchnout PBS, 2 min
- 2) fixovat ve 4% PFA, 10 min
rozpustit 4 g PFA ve 100 ml fosfátového pufru, vyčeřit NaOH, pH upravit na 7,4
- 3) 2x opláchnout PBS, po 2 min
- 4) permeabilizovat v 0,5% TRITON X-100 (ředěno v PBS), 5 min
- 5) 2x opláchnout PBS, po 2 min
- 6) blokovat 1% normálním králičím sérem (ředěno v PBS), 20 min
- 7) inkubovat s primární králičí protilátkou anti-ZO-1 (40 μ l/j., ředěno 1:20 v PBS), 30 min
- 8) 2x opláchnout PBS, po 2 min
- 9) inkubovat s protikráličí sekundární protilátkou značenou AlexaFluor® 488 (40 μ l/j., ředěno 1:100 v PBS), 30 min
- 10) 2x opláchnout PBS, po 5 min
- 11) inkubovat s protilátkou anti- γ H2A.X AlexaFluor® 647 (40 μ l/j., ředěno 1:100 v PBS), 30 min
- 12) 2x opláchnout PBS, po 5 min
- 13) opláchnout destilovanou vodou
- 14) inkubovat s DAPI (1 μ g/ml), 5 min
- 15) opláchnout destilovanou vodou
- 16) sundat ze sklíčka jamky a zamontovat do glycerolového média

4.4.3. Kultivace buněčných linií s bakteriálními složkami a etoposidem

Kultivace probíhala ve 48 jamkové destičce v termostatu (při 37 °C, 95% vlhkosti a při 5% koncentraci CO₂). Do každé jamky jsem dávala 50 000 buněk v 500 µl média. Buňky byly ponechány růst 2 dny (v případě Caco-2 buněk) nebo jeden den v případě RAW 264.7 buněk, které rychleji adherují i se rychleji dělí. Po této době bylo buňkám odebráno médium a vyměněno za roztok bakteriálních složek, případně čistého média (u kontrolních vzorků).

Pro kultivaci s buňkami byly použity 3 různé koncentrace bakteriálních komponent. Koncentrace byla vztažena na obsah proteinů (50 ng/ml, 5 ng/ml a 0,5 ng/ml). Bakteriální komponenty byly ředěny v kompletním médiu s antibiotiky. Jako kontroly sloužily čisté kultivační médium a roztok LPS (Sigma, o koncentraci 5 µg/ml v případě kultivace s Caco-2 buňkami a o koncentraci 1 µg/ml v případě kultivace s RAW 264.7 buňkami). Do každé jamky destičky bylo opět přidáno 500 µl. Kultivace probíhala přibližně 24 hodin v termostatu.

Na poslední hodinu kultivace byl k některým vzorkům přidán etoposid tak, aby výsledná koncentrace byla 100 µM. Do každé jamky (500 µl média) jsem tedy přidala 1,2 µl zásobního etoposidu o koncentraci 25 mg/ml.

Vzorky byly rozděleny tak, aby každý bakteriální vzorek byl v kombinaci s etoposidem i bez něho. Kontrolní vzorky s LPS i čistým médiem byly také vždy ve dvou variantách – s etoposidem a bez něho. Tím bylo dosaženo všech kombinací pro následné porovnávání.

Po kultivaci byl ze vzorků odebrán supernatant, který byl skladován v mikrozskumavkách v -20 °C. Následně byl použit pro stanovení obsahu vybraných cytokinů metodou ELISA. Buňky byly dále zpracovávány na analýzu průtokovou cytometrií.

4.4.4. Průtoková cytometrie

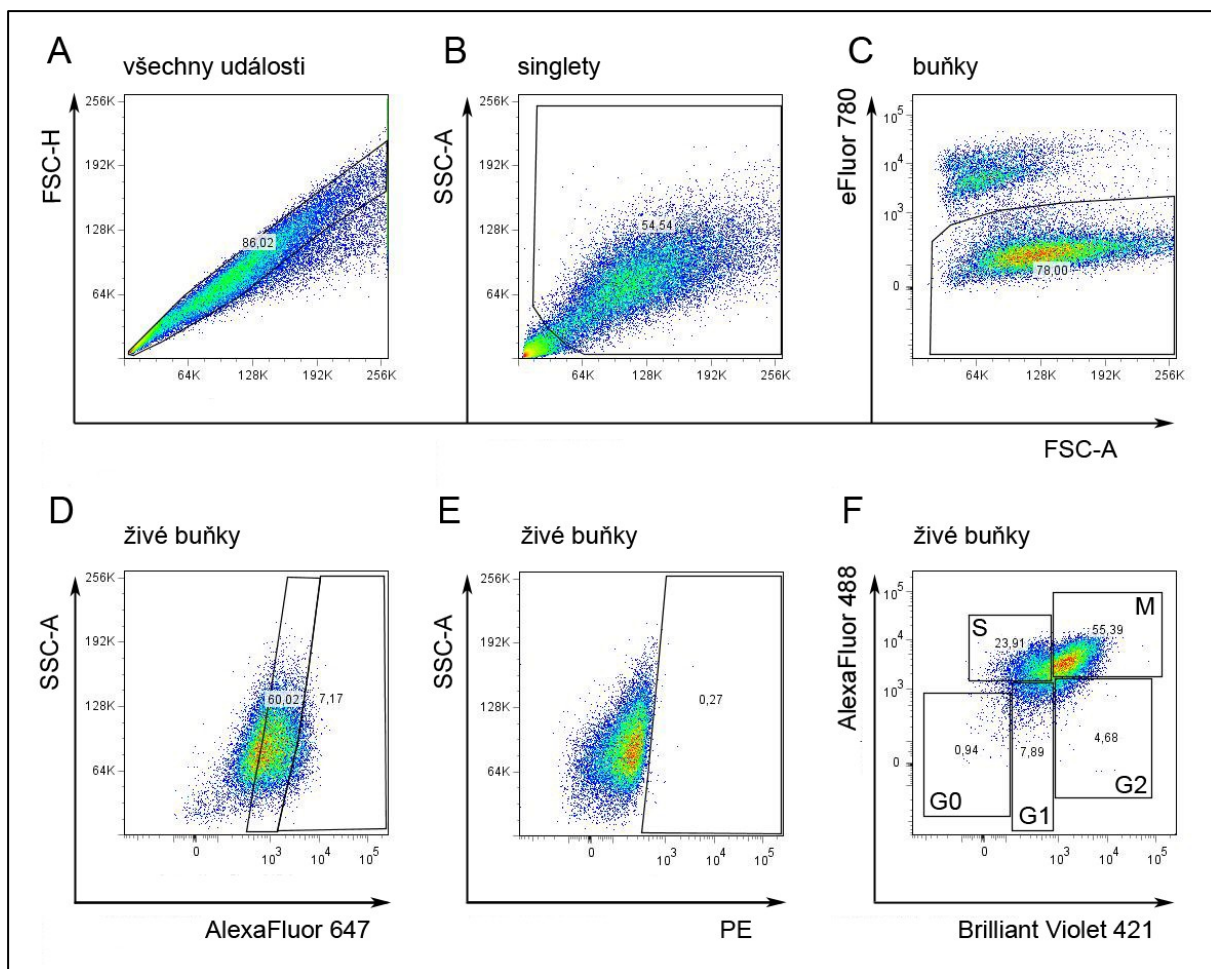
Po ukončení kultivace s bakteriálními složkami (po odebrání média) byly buňky disociovány ode dna a převedeny do suspenze. K RAW 264.7 jsem přidala 200 µl média do každé jamky, destičku jsme umístila na led a buňky jsem ode dna seškrabala pomocí pipety. V případě Caco-2 buněk bylo nutné použít disociační enzym. Používala jsem stejně jako při pasážování roztok trypsinu v EDTA. Nejprve jsem do každé jamky napipetovala 500 µl 0,5mM roztoku EDTA a nechala jsme ho působit 10 minut při pokojové teplotě. Tím došlo k vyvázání iontů a následná disociace byla rychlejší. Roztok EDTA jsem odstranila (tak,

abych nepoškodila vrstvu buněk) a do každé jamky jsem přidala 100 μ l roztoku trypsinu. Nechala jsme ho 5 min působit. Poté jsme reakci zastavila přidáním 200 μ l média.

Buněčné suspenze jsem přepipetovala do destičky pro průtokovou cytometrii (96 jamková, s kulatým dnem). Od této chvíle jsem pracovala nesterilně a destičku jsem držela na ledu. Kromě vzorků jsem přidala do destičky ještě do několika jamek buňky a speciální kuličky UltraComp eBeads (eBioscience), které sloužily jako kontroly pro nastavení průtokového cytometru. Počet těchto kontrolních vzorků odpovídal počtu barev, kterými byly vzorky barveny, + 2 vzorky (nebarvený a kontrolní barvený všemi barvami).

Vzorky jsem pro průtokovou cytometrii barvila pomocí fluorescenčně značených protilátek. Zjišťovala jsem životnost buněk pomocí barvy FVD eFluor® 780, která proniká do buněk. Živé buňky ji aktivně vypuzují, proto zůstanou na rozdíl od mrtvých buněk nenabarvené. Dále jsem použila barvení některých intracelulárních znaků. Zjišťovala jsem proliferaci a fázi buněčného cyklu, ve které se buňky nachází (pomocí barvení protilátkami anti-Ki67 Brilliant Violet® 421 a anti-PCNA AlexaFluor® 488, podle Landberg a Roos 1992), aktivaci reparačních mechanismů (barvení anti- γ H2A.X AlexaFluor® 647) a fosforylaci proteinu p53 (barvení anti-fosfo p53 PE®). Postupovala jsem dle protokolu č. 5. Informace o protilátkách použitých k barvení jsou uvedeny v kapitole 4.7.

Měření bylo prováděno ve Středisku cytometrie a mikroskopie MBÚ pomocí průtokového cytometru LSRII (BD). Data jsem zpracovávala v programu FlowJo 7.25. Na obrázku č. 5 je ukázána gateovací strategie pro výběr živých buněk a z nich následně výběr buněk s aktivovanými reparačními mechanismy, fosforylovaným p53 a na základě přítomnosti faktorů Ki67 a PCNA rozdělení buněk dle fází buněčného cyklu.



Obrázek č. 5: Ukázka gateovací strategie. a) výběr singletů ze všech událostí, b) výběr buněk ze singletů, c) výběr živých buněk (eFluor® 780 negativní), d) výběr živých buněk s aktivovanými reparačními mechanismy, zde rozdělení do tří populací – negativní, slabě pozitivní a silně pozitivní (dle positivity na AlexaFluor® 647), e) výběr živých buněk s fosforylovaným proteinem p53 (PE® pozitivní), f) rozdělení živých buněk dle toho, v jaké fázi buněčného cyklu se nachází – G0 (AlexaFluor® 488 negativní, Brilliant Violet® 421 negativní), G1 (AlexaFluor® 488 negativní, Brilliant Violet® 421 slabě pozitivní), G2 (AlexaFluor® 488 negativní, Brilliant Violet® 421 pozitivní), S (AlexaFluor® 488 pozitivní, Brilliant Violet® 421 negativní), M (AlexaFluor® 488 pozitivní, Brilliant Violet® 421 pozitivní)

Protokol č. 5

- 1) destičku centrifugovat (300 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant
- 2) přidat 150 µl PBS, centrifugovat (300 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant, lehce vortexovat
- 3) blokovat ve 20 µl NMS nebo human FcR binding inhibitoru, 20 min, při 4 °C
pro vyvázání nespecifických Fc receptorů
pro RAW 264.7 buňky – NMS (vlastní příprava, ředěno 1:10 v PBS)
pro Caco-2 buňky – human FcR binding inhibitor (eBioscience, ředěno 1:200 v PBS)

- 4) přidat 130 μ l PBS, centrifugovat (300 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant, lehce vortexovat
- 5) barvit na životnost, v 10 μ l FVD eFluor® 780 (ředěno 1:200 v PBS), 30 min, při 4 °C
- 6) přidat 140 μ l PBS, centrifugovat (300 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant
- 7) přidat 150 μ l PBS, centrifugovat (300 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant, lehce vortexovat
- 8) fixovat ve 140 μ l 70% etanolu, 20 min, v -20 °C
absolutní etanol (VWR Chemicals) naředěn v d H₂O a vychlazen na -20 °C
- 9) centrifugovat (350 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant
- 10) přidat 150 μ l Foxp3 Staining pufru, centrifugovat (350 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant
Foxp3 Staining pufr (eBioscience) ředit 1:10 v dH₂O
- 11) přidat 150 μ l Foxp3 Staining pufru, centrifugovat (350 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant, lehce vortexovat
- 12) barvit na intracelulární znaky, v 10 μ l, 30 min, při 4 °C
anti-Ki67 Brilliant Violet® 421 (ředěno 1:100 ve Foxp3 Staining pufru)
anti-PCNA AlexaFluor® 488 (ředěno 1:100 ve Foxp3 Staining pufru)
anti- γ H2A.X AlexaFluor® 647 (ředěno 1:200 ve Foxp3 Staining pufru)
anti-fosfo p53 PE® (ředěno 1:100 ve Foxp3 Staining pufru)
- 13) přidat 140 μ l Foxp3 Staining pufru, centrifugovat (350 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant
- 14) přidat 150 μ l Foxp3 Staining pufru, centrifugovat (350 g, 4 °C, 5 min), odstranit supernatant, lehce vortexovat
- 15) resuspendovat ve 100 μ l PBS
- 16) změřit na průtokovém cytometru

4.5. Porovnání produkce prozánětlivých cytokinů buňkami v závislosti na kultivaci

Také jsem zjišťovala vliv stimulace buněk jednotlivými bakteriálními složkami a etoposidem na produkci prozánětlivých cytokinů. Používala jsem epitelové (Caco-2 linie) i imunitní (RAW 264.7 linie) buňky. Pro detekci koncentrace určitých cytokinů jsem použila metodu ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

4.5.1. ELISA

Po kultivaci buněk s bakteriálními stimuly byly odebrány supernatanty, které byly zamrazeny v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ty jsem dále použila na stanovení produkce jednotlivých cytokinů. Použila jsem metodu nepřímá sendvičová ELISA, detekční Ab byla biotinylována a bylo využito vazby ke streptavidinu.

Po stimulaci lidských Caco-2 buněk bakteriálními složkami jsem stanovovala koncentraci prozánětlivých cytokinů IL-8, IL-18 a IL-33. Použila jsem komerční ELISA kity (vše od R&D systems):

Human CXCL8/IL-8 DuoSet

Human total IL-18 DuoSet

Human IL-33 DuoSet

Po stimulaci myších RAW 264.7 buněk bakteriálními složkami jsem stanovovala koncentraci prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-12 a TNF- α . Použila jsem komerční ELISA kity (vše od R&D systems):

Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet

Mouse IL-6 DuoSet

Mouse IL-12 p70 DuoSet

Mouse TNF-alpha DuoSet

Postupovala jsem podle doporučených postupů, jen s tím rozdílem, že jsem používala poloviční množství vzorků a protilátek (protokol č. 6). Použila jsem 96 jamkové destičky Maxisorp Nunc (Thermo Scientific), celou dobu jsem pracovala při pokojové teplotě. Ředění jednotlivých protilátek, standardů a vzorků je uvedeno v tabulce č. 2. Vzorky i standardy jsem připravila v dubletech. Použila jsem 7 ředění standardů a *blank* (1% BSA v PBS, v němž byly vzorky i standardy ředěny). K promývání jsem používala automatickou promývačku MultiWash II (TriContinent). Optická denzita vzorků byla měřena pomocí spektrofotometru Multiskan Ascent (Labsystems) při vlnové délce 450 nm, jako referenční byla měřena optická denzita při 650 nm.

cytokin	ředění				
	c AB	standard	vzorky	d Ab	STR-HRP
IL-8 (lidský)	180x	50x	neředěny	180x	200x
IL-18 (lidský)	120x	200x	neředěny	60x	40x
IL-33 (lidský)	1000x	100x	neředěny	60x	40x
IL-1β (myší)	120x	130x	neředěny	60x	40x
IL-6 (myší)	120x	100x	ředěny 10x	60x	40x
IL-12 (myší)	120x	92x	neředěny	60x	40x
TNF-α (myší)	125x	100x	ředěny 10x	60x	40x

Tab. č. 2. Hodnoty koncentrací (ředění) jednotlivých složek ELISA kitů pro stanovení cytokinů.

Protokol č. 6

- 1) pokrýt destičku navazovací protilátkou (c Ab) ředěnou v PBS (50 μ l / jamku), inkubovat přes noc
- 2) 3x promýt destičku promývacím pufrem (400 μ l / jamku), vyklepnout a osušit
- 3) blokovat 1% BSA v PBS (300 μ l / jamku), alespoň 1 hod
- 4) 3x promýt destičku promývacím pufrem (400 μ l / jamku), vyklepnout a osušit
- 5) přidat do destičky standard a vzorky ředěné v 1% BSA* v PBS (50 μ l / jamku), inkubovat 2 hod
- 6) 3x promýt destičku promývacím pufrem (400 μ l / jamku), vyklepnout a osušit
- 7) přidat detekční Ab ředěnou v 1% BSA* v PBS (50 μ l / jamku), inkubovat 2 hod
- 8) 3x promýt destičku promývacím pufrem (400 μ l / jamku), vyklepnout a osušit
- 9) přidat STR-HRP ředěný v 1% BSA* v PBS (50 μ l / jamku), inkubovat 20 min, ve tmě
- 10) 3x promýt destičku promývacím pufrem (400 μ l / jamku), vyklepnout a osušit
- 11) přidat substrátový roztok (50 μ l / jamku), inkubovat 20 min (nebo déle, dle potřeby), ve tmě
- 12) přidat zastavovací roztok (25 μ l / jamku)
- 13) změřit optickou denzitu

* v případě stanovení lidského IL-8 byl místo 1% BSA v PBS použit roztok 0,1% BSA a 0,05% Tweenu v PBS

4.5.1.1. Použité roztoky

- PBS
 - 90 g NaCl (Lachema) + 2 g NaH₂PO₄·2H₂O (Lachema) + 12 g Na₂HPO₄·12H₂O (Lachema)
 - doplnit destilovanou vodou do celkového objemu 1 l
 - upravit pH na hodnotu 7,2 – 7,4 (pomocí 10M NaOH)
 - před použitím ředit 10x destilovanou vodou
- promývací pufr
 - 0,05% roztok Tween20 (Sigma) v PBS
- 1% roztok BSA
 - 1 g BSA (Sigma)
 - rozpustit v 1 l PBS
- citrátový pufr
 - 2,94 g citronanu sodného (Lachema)
 - doplnit destilovanou vodou do celkového objemu 100 ml
 - upravit pH na hodnotu 4,2 (pomocí kyseliny citrónové: 21,014 g + 100 ml H₂O)
- TMB (tetrametylbenzidin)
 - 40 mg TMB (Sigma) do 27 ml dimethylformamidu (Lachema)
 - roztok vnést skleněnou pipetou do 73 ml destilované vody
- substrátový roztok
 - 1 ml citrátového pufru + 1 ml TMB + 0,45 µl 37% H₂O₂ (Chemapol)
 - připravit těsně před použitím
- zastavovací roztok (2M H₂SO₄)
 - 1 ml koncentrované H₂SO₄ do 9 ml destilované vody

4.6. Detekce vlivu živých bakterií na porušení vrstvy adherentních buněk

Součástí práce bylo porovnat vliv jednotlivých kmenů *E. coli* na porušení vrstvy epitelu. Některé bakterie jsou schopny v hostitelském organismu poškozovat střevní epitel a narušovat tím bariérovou funkci střeva. Jako *in vitro* model sloužila vrstva Caco-2 buněk pokrývající dno jamek v destičce.

4.6.1. Kultivace Caco-2 buněk s živými bakteriemi

Caco-2 buňky byly pasážovány a nasazeny na 48 jamkovou destičku o koncentraci 50 000 buněk na jamku. Objem média byl v každé jamce 500 μ l. Destička byla umístěna do termostatu na 3 dny, aby buňky v jamkách vytvořily souvislou vrstvu (monolayer).

Poté jsem z buněk odstranila staré médium a opláchla je kultivačním médiem, které bylo připraveno bez antibiotik (DMEM + 10% FBS + 1% glutamin + 0,15% NaHCO₃). Nakonec bylo přidáno 500 μ l suspenze bakterií nebo kontrolních vzorků. Během oplachování jsem dbala na to, aby nedošlo k poškození vrstvy buněk.

Živé bakterie byly ředěny v buněčném médiu bez antibiotik. Byly použity 3 různé koncentrace (ředění 10x, 100x a 1000x). Jako kontrolní vzorky bylo použito čisté médium a roztoky peroxidu vodíku (o koncentracích 100 mM, 50 mM a 25 mM), které byly připraveny ze zásobního 37% roztoku H₂O₂ ředěním v buněčném médiu.

Buňky byly s bakteriemi kultivovány po dobu 4 hodin. Po kultivaci jsem odebrala médium (s odloupenými buňkami) do mikrozkušavek. Přisedlé buňky byly disociovány pomocí trypsinu.

4.6.2. Průtoková cytometrie

Vzorky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Zkoumána byla životnost buněk (barvení FVD eFluor® 780) a apoptóza (barveno anti-Annexin V FITC®). Informace o protilátkách použitých k barvení jsou uvedeny v kapitole 4.7. Zpracování vzorků a barvení probíhalo dle protokolu č. 7 v 96 jamkové destičce s kulatým dnem pro průtokovou cytometrii (TPP).

Měření bylo prováděno ve Středisku cytometrie a mikroskopie MBÚ pomocí průtokového cytometru LSRII (BD). Data jsem zpracovávala v programu FlowJo.

Protokol č. 7

- 1) zkumavky s odebraným kultivačním médiem s oddělenými buňkami držet na ledu
- 2) přisedlé buňky opatrně omýt 500 µl sterilního fyziologického roztoku a přidat 100 µl roztoku trypsinu v EDTA a umístit na 5 minut do 37 °C, poté reakci zastavit 200 µl média
- 3) všechny vzorky centrifugovat (300 g, 5 min, 4 °C), odlít supernatant
- 4) peletu resuspendovat v 200 µl média (kompletní DMEM, s antibiotiky)
- 5) vzorky přepipetovat do 96 jamkové destičky na průtokovou cytometrii (s kulatým dnem), přidat do 4 jamek buňky na kontrolní barvení
- 6) centrifugovat (300 g, 5 min, 4 °C), odlít supernatant
- 7) přidat 150 µl PBS, centrifugovat (300 g, 5 min, 4 °C), odlít supernatant, lehce vortexovat
- 5) blokovat ve 20 µl human FcR binding inhibitoru (eBioscience, ředěno 1:200 v PBS), 20 min, při 4 °C
pro vyvázání nespecifických Fc receptorů
- 6) přidat 130 µl PBS, centrifugovat (300 g, 5 min, 4 °C), odlít supernatant, lehce vortexovat
- 7) barvit v 10 µl FVD eFluor® 780 (ředěno 1:200 v PBS), 30 min, při 4 °C
- 8) přidat 140 µl PBS, centrifugovat (300 g, 5 min, 4 °C), odlít supernatant
- 9) promýt 2x ve 150 µl HEPES pufru a centrifugovat (300 g, 5 min, 4 °C), odlít supernatant, lehce vortexovat
0,1 M HEPES (Sigma-Aldrich), pH = 7,4
- 10) barvit v 10 µl Annexin V FITC® (ředěno 1:100 v HEPES pufru), 10 min, při pokojové teplotě
- 11) resuspendovat ve 100 µl PBS
- 12) změřit na průtokovém cytometru

4.7. Seznam použitých protilátek

Tabulka č. 3 shrnuje informace o protilátkách použitých k barvení vzorků pro konfokální mikroskopii a průtokovou cytometrii.

cílový antigen	fluorochrom	izotyp	klon	hostitelský organismus	cílový organismus	výrobce
mrtvé buňky	eFluor® 780				všechny	eBioscience
Annexin V	FITC®				všechny	eBioscience
Ki67	Brilliant Violet® 421	IgG2a	16A8	krysa	člověk/ myš	BioLegend
PCNA	AlexaFluor® 488		PC10		člověk/ myš/ krysa	BioLegend
γ H2A.X	AlexaFluor® 647		2F3	myš	člověk/ myš	BioLegend
fosforylovaný p53	PE®		261352		člověk	Invitrogen
zonulin (ZO-1)	neznačená		pab	králík	člověk/ myš/ krysa	Invitrogen
králičí Ab	AlexaFluor® 488			osel	králík	Jackson ImmunoResearch

Tabulka č. 3: seznam protilátek použitých pro barvení vzorků pro konfokální mikroskopii a průtokovou cytometrii

4.8. Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) pomocí analýzy rozptylu jednoduchého třídění (One-way ANOVA). Byly použity testy Tukey a Dunnett a hodnota p byla stanovena na 0,05.

5. Výsledky

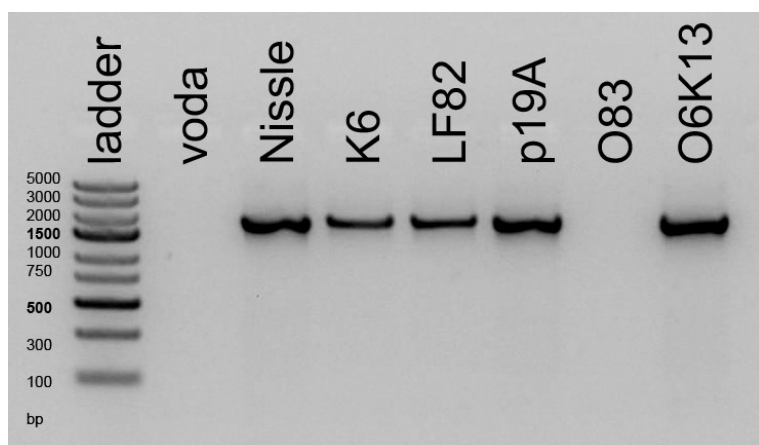
5.1. Detekce genů pro cyklomoduliny u jednotlivých kmenů *E. coli*

U jednotlivých kmenů *E. coli* jsem zjišťovala přítomnost genů pro jednotlivé cyklomoduliny. V tabulce č. 4 jsou shrnuty výsledky.

	Nissle 1917	K6	LF82	p19A	O83	O6K13
<i>pks</i>	+	+	+	+	–	+
<i>CNF1</i>	–	+	?	+	+	+
<i>CNF2</i>	–	+	?	+	+	+
<i>CNF3</i>	–	–	–	–	–	–
<i>CIF</i>	–	–	–	–	–	–
<i>CDT1</i>	–	–	–	–	–	–
<i>CDT2</i>	–	–	–	–	–	–

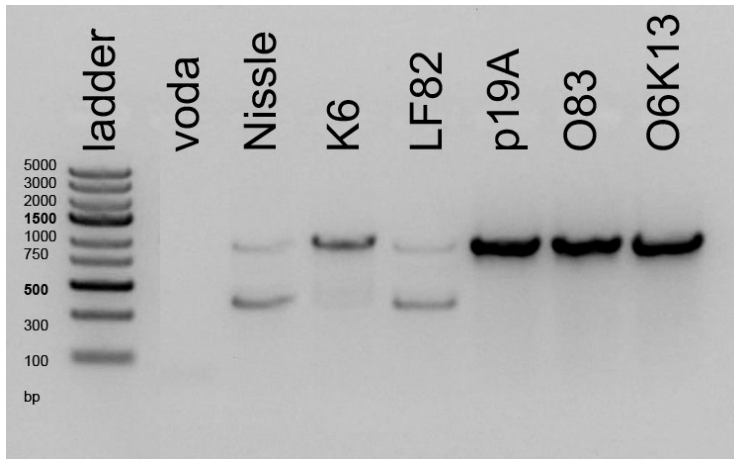
Tabulka č. 4: Shrnutí výsledků přítomnosti genů pro cyklomoduliny v genomech jednotlivých *E. coli*. + přítomnost genu, – nepřítomnost genu, ? pravděpodobná přítomnost genu

Genotoxický ostrůvek genů *pks*, jehož přítomnost v genomu bakterie vede k produkci kolibaktinu, jsem detekovala u pěti kmenů – Nissle 1917, K6, LF82, p19A a O6K13. Pouze probiotický kmen O83 ho neobsahuje (obrázek č. 6).

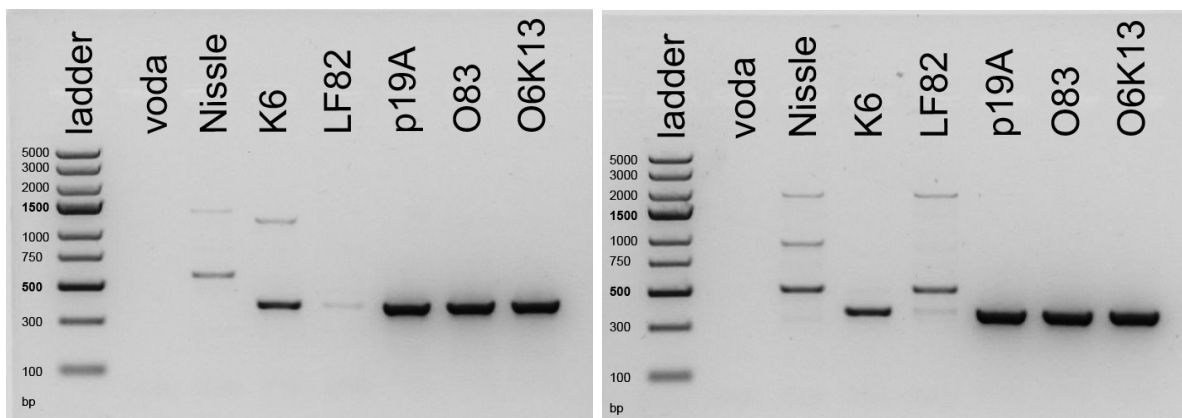


Obrázek č. 6: Detekce přítomnosti genotoxického ostrůvku *pks* v genomech jednotlivých kmenů *E. coli*. Obrázek ukazuje výsledek elektroforézy po předchozí PCR s použitím primerů PKS. Předpokládaný PCR produkt by měl mít velikost přibližně 2119 bp. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo DNA.

Gen pro CNF1 byl jednoznačně detekován u kmenů *E. coli* p19A, O83 a O6K13. U *E. coli* K6 byl detekován slabší produkt. U kmenů Nissle 1917 a LF82 se pravděpodobně primery vázaly ještě na jiná místo genomu. Získala jsem totiž více produktů (obrázky č. 7 a 8).

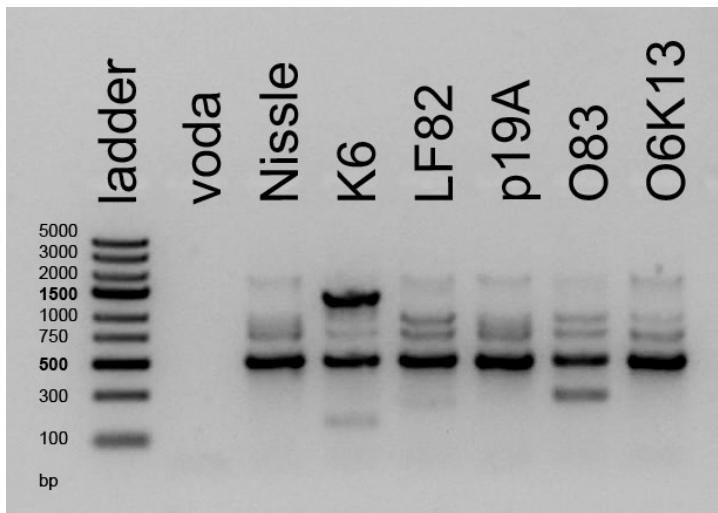


Obrázek č. 7: Detekce přítomnosti genu pro CNF1 v genomech jednotlivých kmenů *E. coli*. Obrázek ukazuje výsledek elektroforézy po předchozí PCR s použitím primerů CNF1. Předpokládaný PCR produkt by měl mít velikost přibližně 1112 bp. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo DNA.

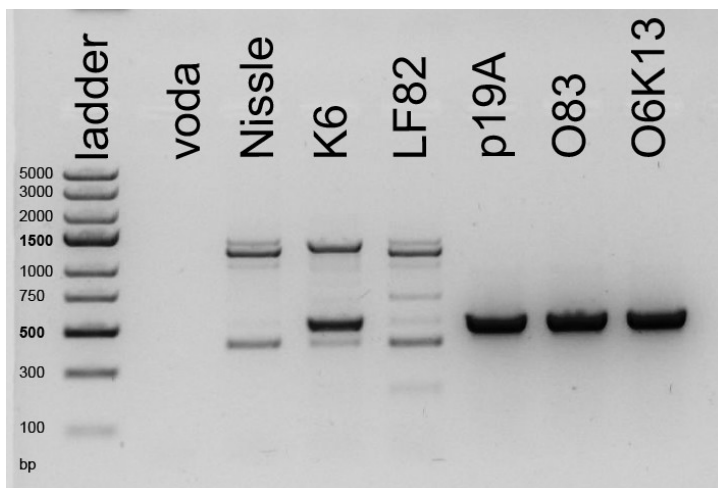


Obrázek č. 8: Detekce přítomnosti genu pro CNF1 v genomech jednotlivých kmenů *E. coli*. Obrázek ukazuje výsledek elektroforézy po předchozí PCR s použitím primerů CNF1a a CNF1b. Předpokládané PCR produkty by měly mít velikost přibližně 411 a 404 bp. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo DNA.

Primery ohraničující gen pro CNF2 navržené podle článku Dubois et al. 2010 se vázaly nespecificky na několik míst v genomu a dávaly vzniknout více produktům. Vlastní gen pro CNF2 byl pravděpodobně detekován pouze u *E. coli* K6 (obrázek č. 9). Námi navržené primery se vázali o něco specifičtěji, přesto dávaly u kmenů Nissle 1917, K6 a LF82 vzniknout více produktům (obrázek č. 10).

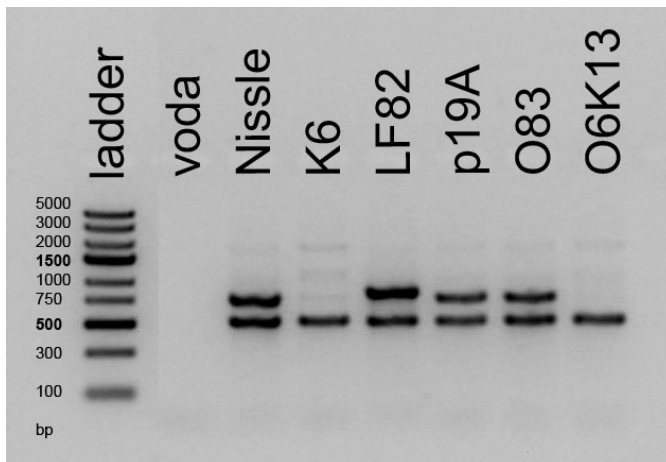


Obrázek č. 9: Detekce přítomnosti genu pro CNF2 v genomech jednotlivých kmenů *E. coli*. Obrázek ukazuje výsledek elektroforézy po předchozí PCR s použitím primerů CNF2. Předpokládaný PCR produkt by měl mít velikost přibližně 1241 bp. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo DNA.



Obrázek č. 10: Detekce přítomnosti genu pro CNF2 v genomech jednotlivých kmenů *E. coli*. Obrázek ukazuje výsledek elektroforézy po předchozí PCR s použitím primerů CNF2a. Předpokládaný PCR produkt by měl mít velikost přibližně 460 bp. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo DNA.

Přítomnost genu pro CIF nebyla detekována u žádné z bakterií *E. coli*. Primery se vážaly nespecificky (obrázek č. 11).



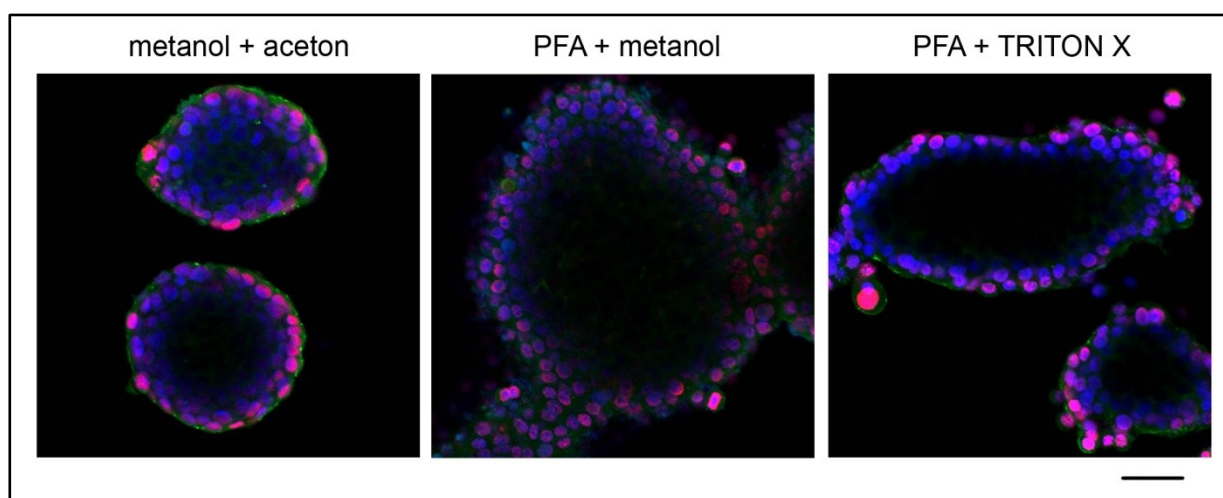
Obrázek č. 11: Detekce přítomnosti genu pro CIF v genomech jednotlivých kmenů *E. coli*. Obrázek ukazuje výsledek elektroforézy po předchozí PCR s použitím primerů CIF. Předpokládaný PCR produkt by měl mít velikost přibližně 383 bp. Kontrolní vzorek obsahoval vodu místo DNA.

Geny pro cyklomoduliny CNF3, CDT1 a CDT2 nebyly detekovány u žádného ze zkoumaných kmenů *E. coli*.

5.2. Porovnání vlivu kultivace buněk se složkami *E. coli* a etoposidem na životnost, produkci a reparaci DSB, proliferaci a na fosforylaci p53

Ze začátku jsem pro *in vitro* experimenty používala linii lidských epitelových buněk HT-29. Tento model se ukázal jako nevhodný, protože buňky tvoří shluky a produkují výrazný slizovitý obal. Díky těmto vlastnostem nemohou protilátky pronikat do buněk uvnitř shluků.

Vyzkoušela jsem různé typy fixace, ale přesto byly výsledky stejné (obrázek č. 12). Dále jsem používala jako model epitelu pouze buněčnou linii Caco-2 buněk.



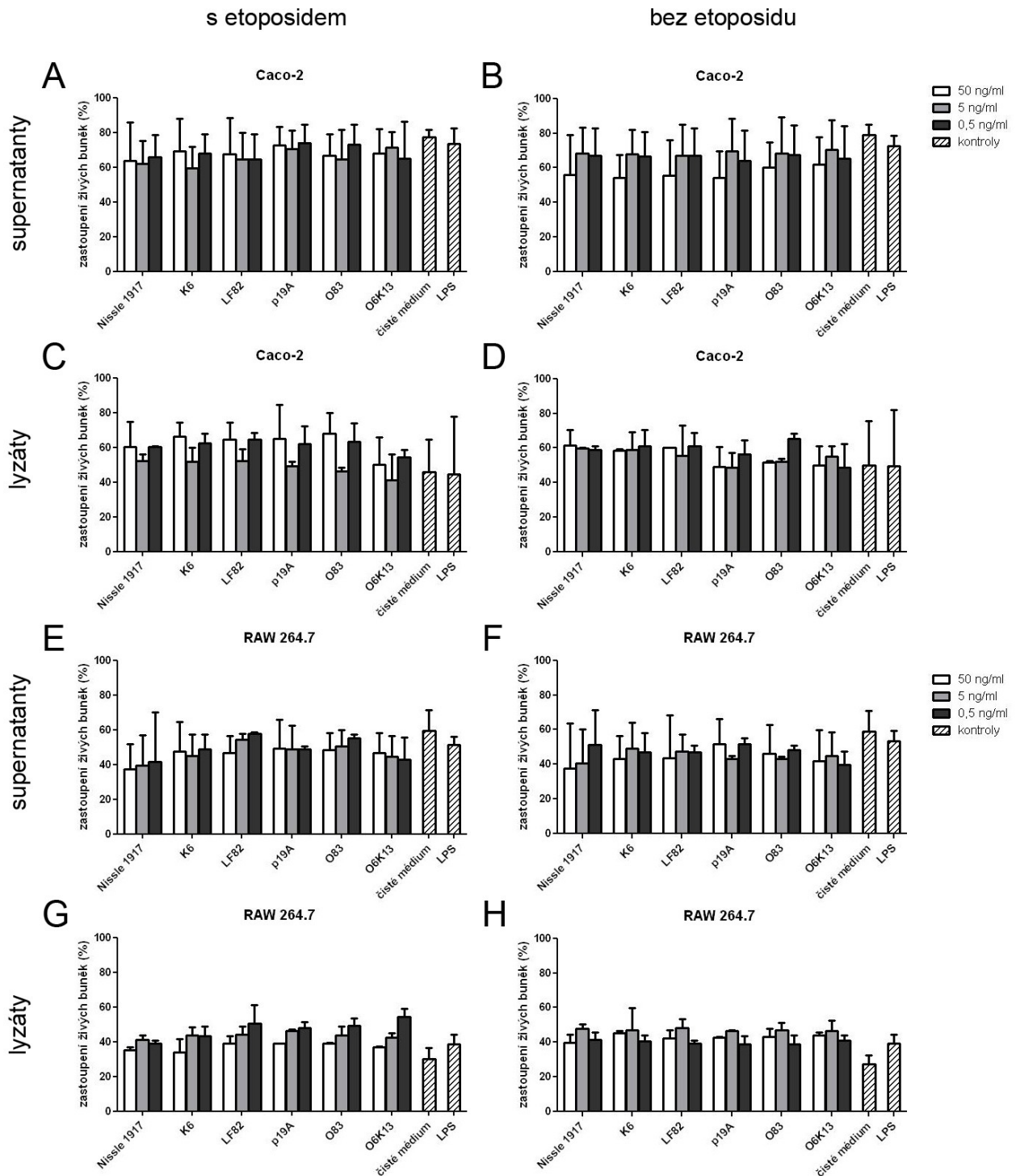
Obrázek č. 12: Zobrazení buněk HT-29 buněk barvených intracelulárním barvením po použití různých typů fixace. Měřítka zobrazuje 100 μm .

- zelená – buněčné spoje (barveno anti-ZO-1 a sekundární protikráličí protilátkou AlexaFluor® 488)
- modrá – buněčná jádra (DAPI)
- červená – aktivované raprační mechanismy po poškození DNA (anti $\gamma\text{H2A.X}$ AlexaFluor® 647)

5.2.1. Hodnocení vlivu na životnost

Stimulace bakteriálními složkami neměla zásadní vliv na životnost buněk. Nepozorovala jsem signifikantní rozdíly při kultivaci s různými složkami a kmeny bakterií. Ani přidání etoposidu nemělo na životnost buněk vliv (graf č. 1).

Životnost Caco-2 buněk se pohybovala v rozmezí 50 – 80 %, u RAW 264.7 buněk byla obecně nižší, mezi 30 – 60 %.



Graf č. 1: Životnost buněk v závislosti na stimulaci. Statisticky byly porovnány hodnoty po stimulaci jednotlivými bakteriemi vůči sobě i vůči kontrolám. Byl porovnán vliv koncentrace i přítomnosti etoposidu.

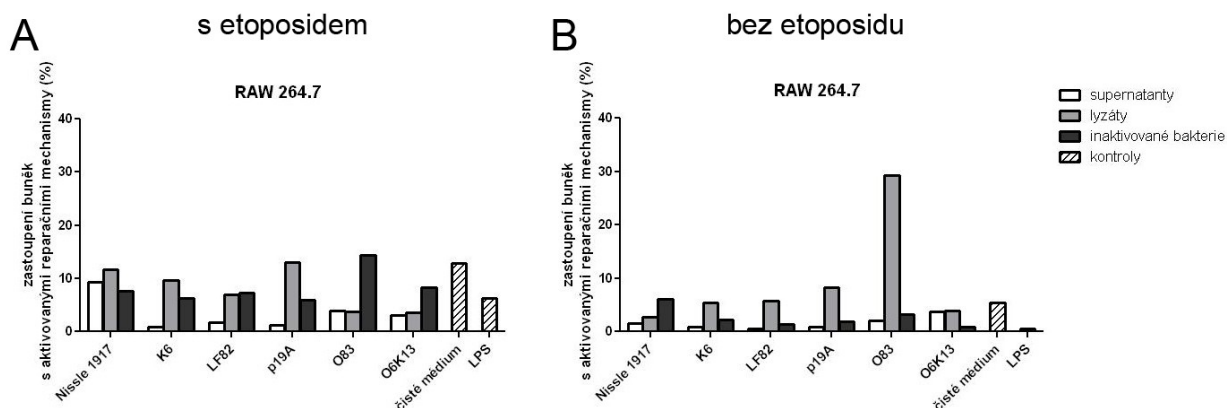
a) kultivace Caco-2 buněk s bakteriálními supernatanty a etoposidem, b) kultivace Caco-2 buněk s bakteriálními supernatanty, c) kultivace Caco-2 buněk s bakteriálními lyzáty a etoposidem, d) kultivace Caco-2 buněk s bakteriálními lyzáty, e) kultivace RAW 264.7 buněk s bakteriálními supernatanty a etoposidem, f) kultivace RAW 264.7 buněk s bakteriálními supernatanty, g) kultivace RAW 264.7 buněk s bakteriálními lyzáty a etoposidem, h) kultivace RAW 264.7 buněk s bakteriálními lyzáty

5.2.2. Hodnocení vlivu na aktivaci reparačních mechanismů

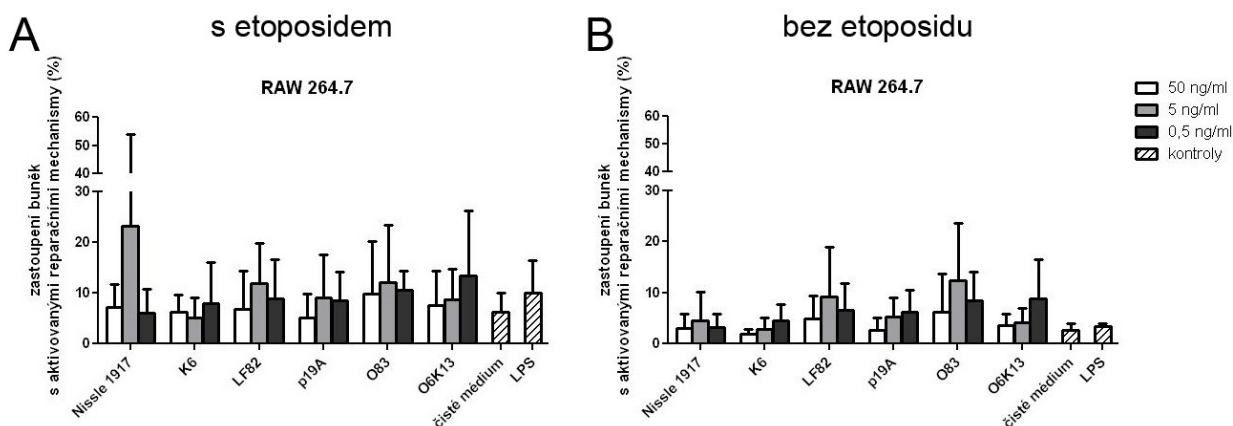
Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v aktivaci reparačních mechanismů v rozdílně stimulovaných buňkách. Bakteriální kmen, složka, koncentrace ani přítomnost etoposidu neměly na reparaci DNA vliv (grafy č. 2 – 7, obrázky č. 13 a 14).

Vizuálně je míra reparační o něco vyšší při kultivaci s etoposidem. Ten jako cytostatikum totiž působí vyšší míru poškození DNA v buňkách. Proto buňky reagují zvýšením aktivace reparačních mechanismů. Avšak rozdíly mezi stimulací různými bakteriálními složkami či kmeny nejsou patrné ani při stimulaci bez etoposidu ani v kombinaci s etoposidem.

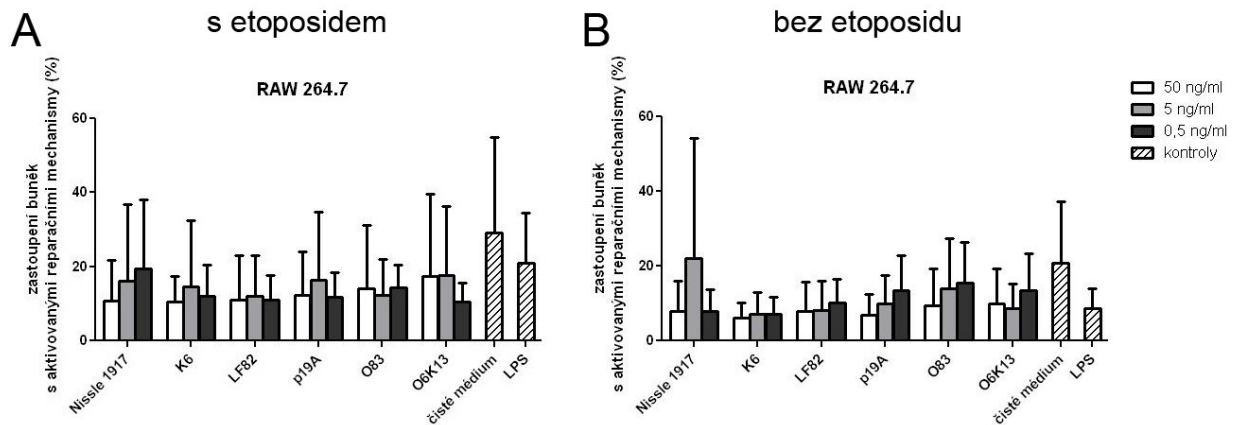
RAW 264.7:



Graf č. 2: Porovnání reparační DNA v imunitních buňkách v závislosti na stimulaci složkami různých kmenů *E. coli*. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

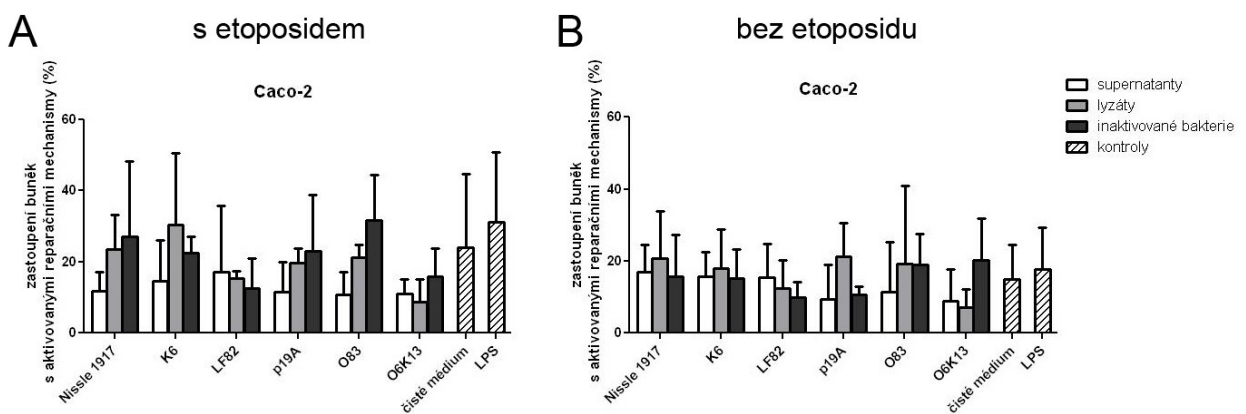


Graf č. 3: Detekce reparační DSB v buňkách RAW 264.7 po kultivaci s bakteriálními supernatanty. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

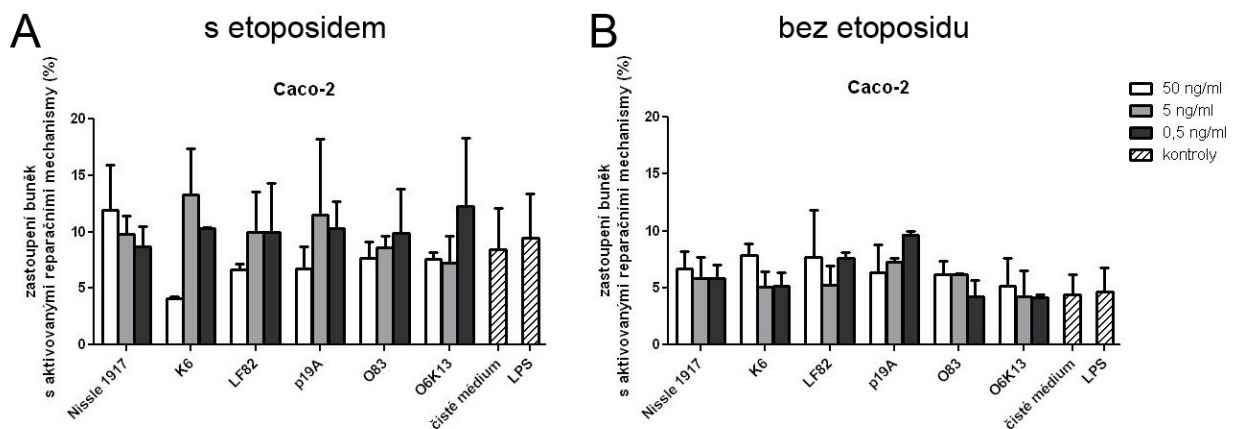


Graf č. 4: Detekce reparační DSB v buňkách RAW 264.7 po kultivaci s bakteriálními lyzáty. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

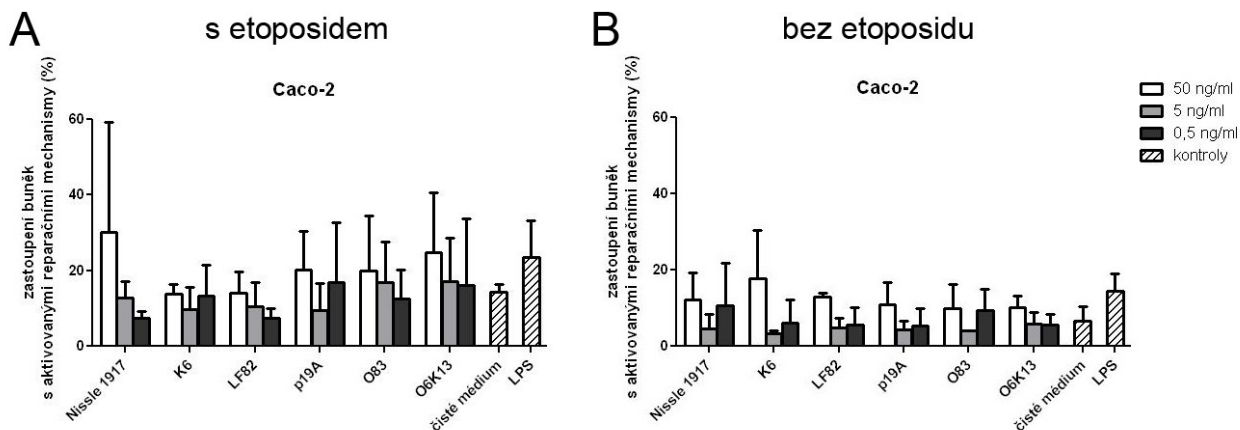
Caco-2:



Graf č. 5: Porovnání reparační DNA v epitelových buňkách v závislosti na stimulaci složkami různých kmenů *E. coli*. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

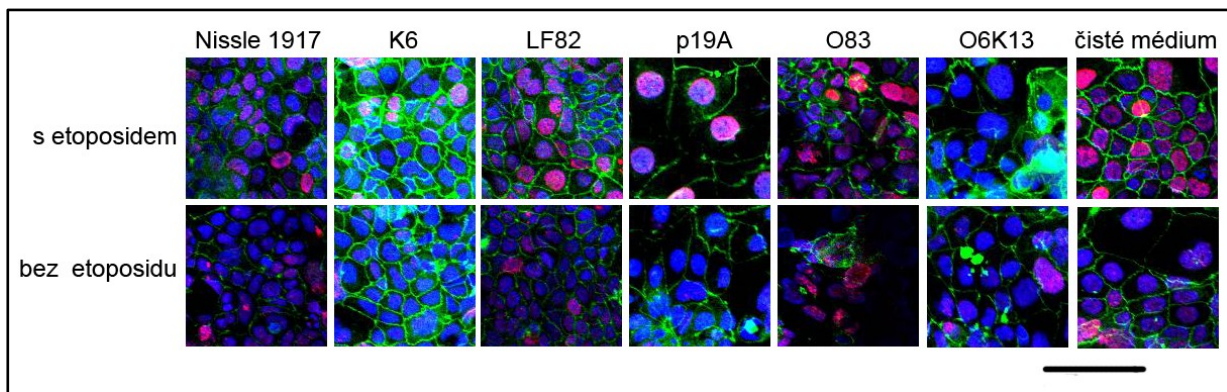


Graf č. 6: Detekce reparační DSB v buňkách Caco-2 po kultivaci s bakteriálními supernatanty. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu



Graf č. 7: Detekce reparace DSB v buňkách Caco-2 po kultivaci s bakteriálními lyzáty. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

Následující obrázky (č. 13 a 14) z konfokálního mikroskopu dokumentují přítomnost aktivovaných reparačních mechanismů v buňkách linie Caco-2. Pro množství opravovaných DSB v jednotlivých buňkách ovšem nebylo možné stanovit míru reparace kvantitativně. Opět vizuálně je vyšší míra reparace při současné stimulaci etoposidem. Obecně nejnižší úroveň reparace se jeví při stimulaci kmeny O6K13 a K6.

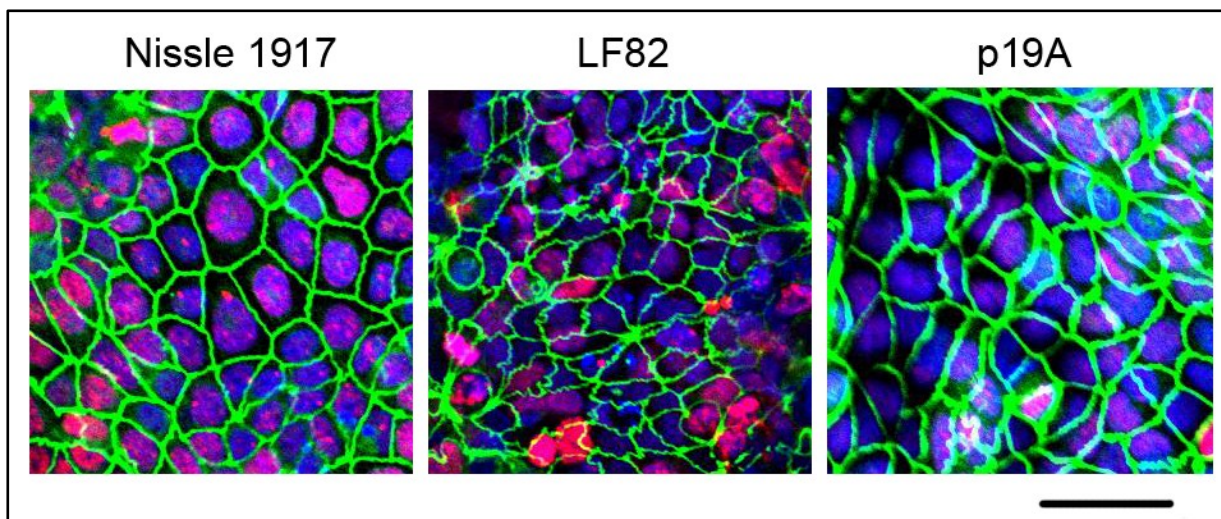


Obrázek č. 13: Porovnání aktivace reparačních mechanismů v Caco-2 buňkách v závislosti na stimulaci lyzáty jednotlivých kmenů *E. coli*. Jako kontrolní vzorek sloužilo čisté kultivační médium. Měřitko zobrazuje 100 μ m.

zelená – buněčné spoje (barveno anti-ZO-1 a sekundární protikráličí protilátkou AlexaFluor® 488)

modrá – buněčná jádra (DAPI)

červená – aktivované reparační mechanismy po poškození DNA (anti γ H2A.X AlexaFluor® 647)



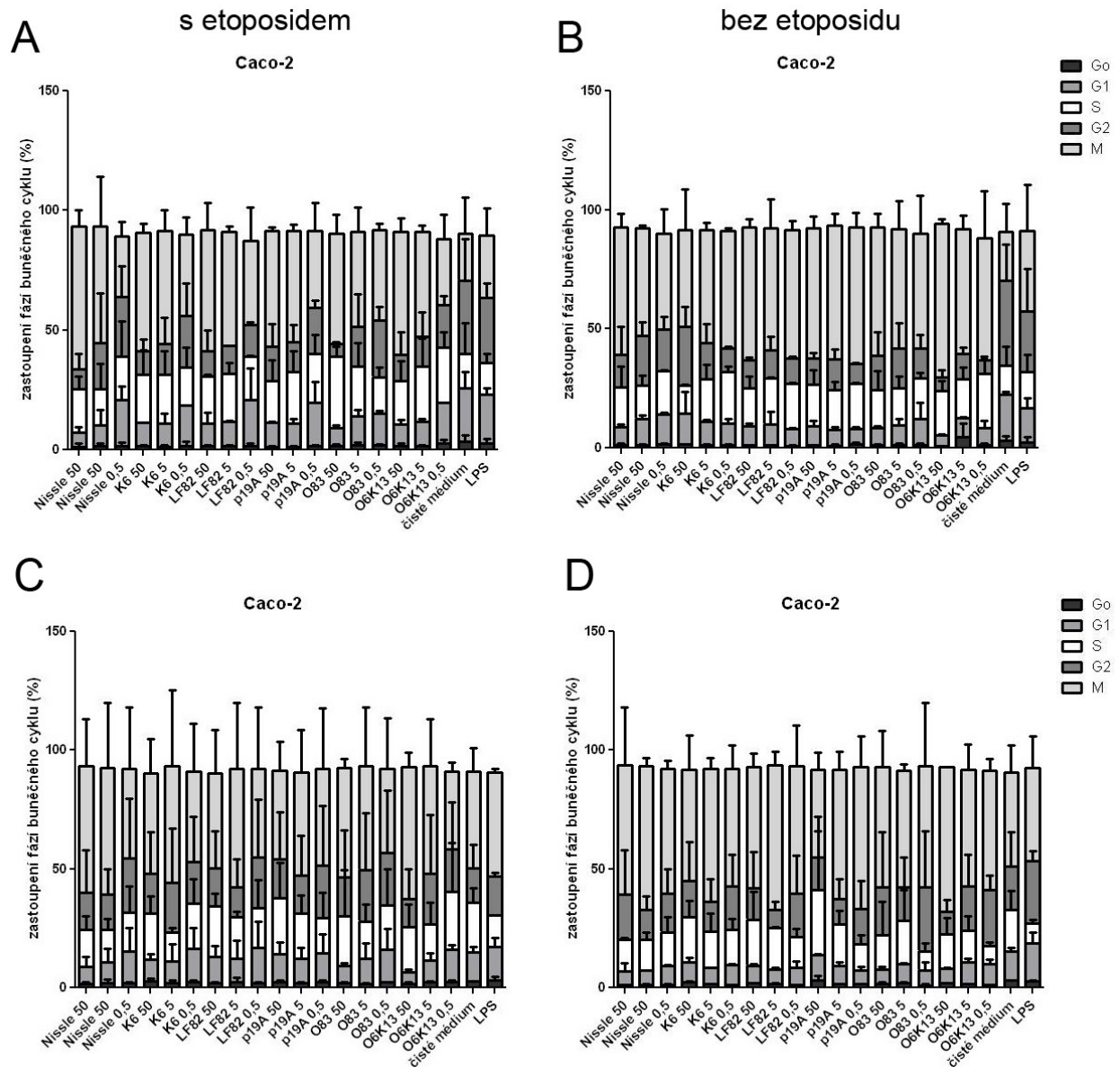
Obrázek č. 14: Porovnání aktivace reparačních mechanismů v Caco-2 buňkách v závislosti na stimulaci supernatanty z kultivace vybraných kmenů *E. coli*. Každý červený bod reprezentuje jeden DSB. V buňkách s výrazným poškozením není možné jednotlivé zlomy od sebe rozeznat a tudíž ani zaznamenat jejich počet. Měřítko zobrazuje 100 μm .

- zelená* – buněčné spoje (barveno anti-ZO-1 a sekundární protikráličí protilátkou AlexaFluor® 488)
- modrá* – buněčná jádra (DAPI)
- červená* – aktivované reparační mechanismy po poškození DNA (anti $\gamma\text{H2A.X}$ AlexaFluor® 647)

5.2.3. Hodnocení vlivu na proliferaci

Po kultivaci buněk se složkami jednotlivých kmenů *E. coli* jsem zjišťovala, jestli dochází k ovlivnění proliferace buněk v závislosti na stimulaci. Pomocí stanovení přítomnosti faktorů Ki67 a PCNA bylo možno určit, jestli si buňky zachovávají schopnost proliferace a v jaké fázi buněčného cyklu se nacházejí.

Naprostá většina buněk linie Caco-2 si zachovává i po stimulaci bakteriemi schopnost proliferace, v G0 fázi se vyskytuje jen velmi málo buněk (jednotky procent). Naopak velké množství buněk se nachází ve fázi mitózy (graf č. 8). Může to být způsobeno tím, že se jedná o nádorovou linii buněk, tudíž mají zvýšenou proliferační schopnost. Ovlivnění bakteriemi nehraje roli, protože nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi buňkami stimulovanými a kontrolami s čistým médiem.



Graf č. 8: Rozlišení fází buněčného cyklu, ve kterých se nacházejí Caco-2 buňky po kultivaci s bakteriálními supernatanty. a) stimulace bakteriálními supernatanty kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bakteriálními supernatanty bez etoposidu, c) stimulace bakteriálními lyzáty kombinovaná s etoposidem, d) stimulace bakteriálními lyzáty bez etoposidu

5.2.4. Hodnocení vlivu na fosforylaci p53

Jen u malé části buněk byla zachycena fosforylace proteinu p53. Jednalo se o jednotky procent buněk. Rozdíly ve vztahu ke stimulaci buněk nebyly patrné.

5.3. Porovnání vlivu kultivace buněk se složkami *E. coli* a etoposidem na produkci prozánětlivých cytokinů

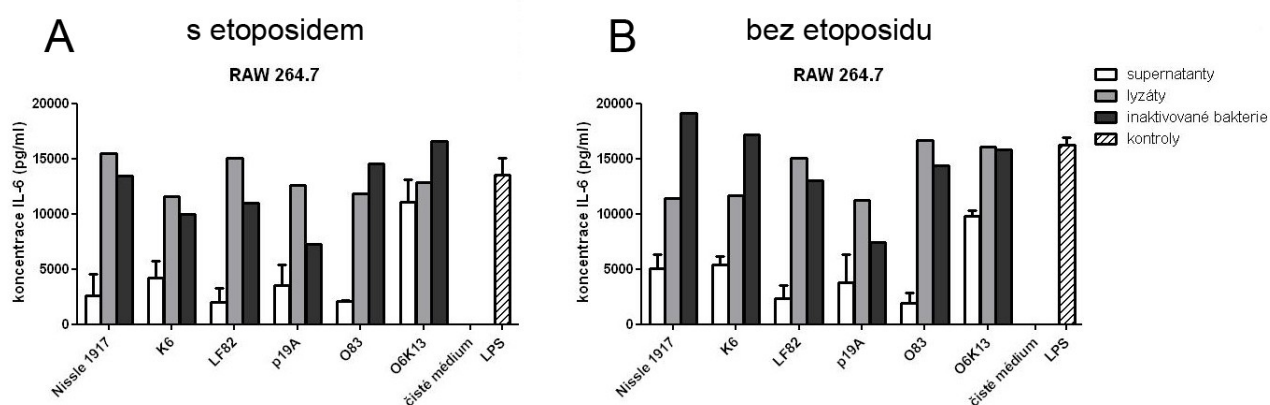
Porovnávala jsem produkci některých prozánětlivých cytokinů imunitními i epitelovými buňkami v závislosti na stimulaci.

Při stimulaci imunitních buněk (makrofágy, linie RAW 264.7) byla stanovována produkce cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-12 a TNF- α .

Zaznamenané hladiny IL-1 β a IL-12 byly velmi nízké (0 nebo v řádech jednotek pg/ml tedy pod limitem detekce). Buňky RAW 264.7 je po 24 hodinové kultivaci s bakteriálními složkami neprodukovaly.

Produkce IL-6 RAW 264.7 buňkami se pohybovala v tisících pg/ml.

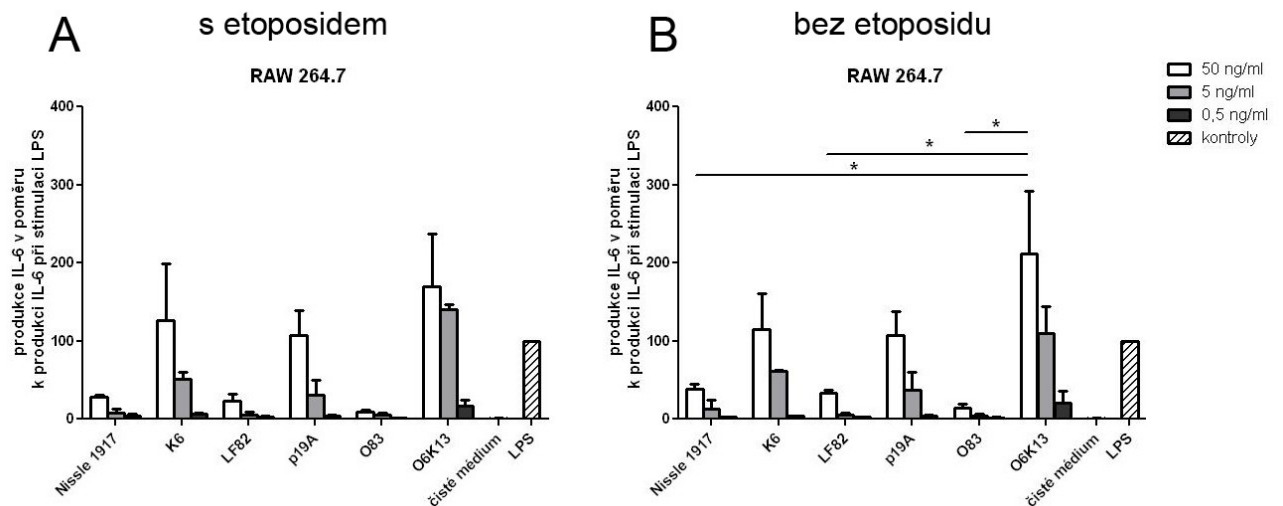
Mezi stimulací s etoposidem a bez něho nebyly prokázány významné rozdíly. Kultivace s bakteriálními supernatanty obecně vedla k nižší produkci IL-6 než kultivace s jinými bakteriálními stimuly. Jen v případě *E. coli* O6K13 byl vliv supernatantu podobný jako v případě lyzátů či inaktivovaných bakterií. Vždy vycházel signifikantní rozdíl mezi kontrolními vzorky (stimulace LPS a nestimulované buňky) (graf č. 9).



Graf. č 9: Produkce IL-6 buňkami RAW 264.7 v závislosti na stimulaci složkami různých kmenů *E. coli*. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

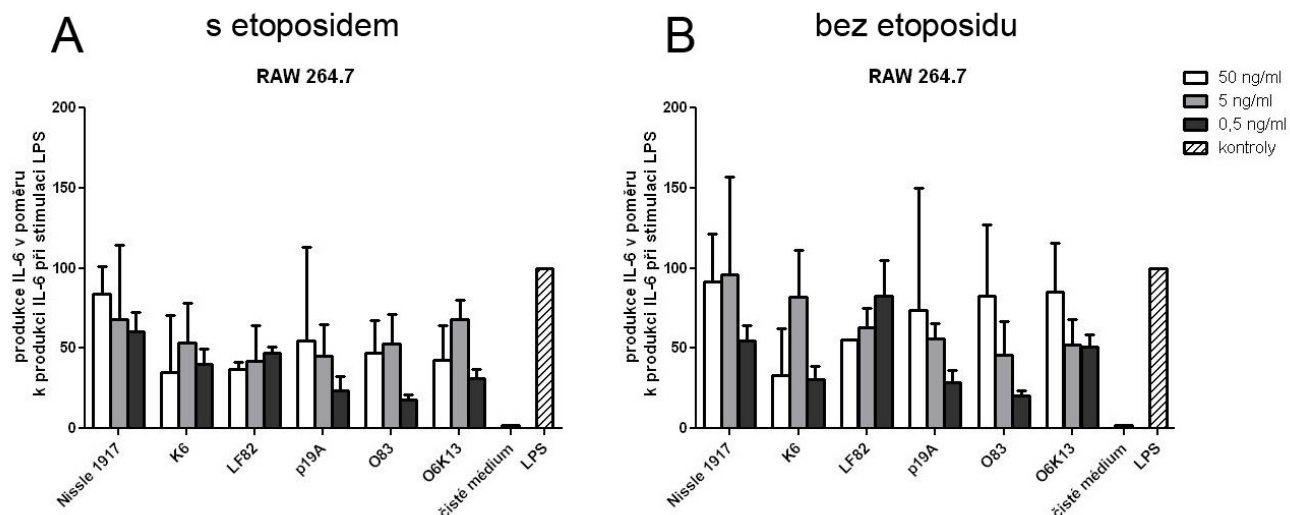
Při stimulaci bakteriálními supernatanty závisela produkce IL-6 na stimulu a jeho koncentraci (graf č. 10). Produkce IL-6 byla nejvyšší v případě stimulace pomocí *E. coli* kmene O6K13. Při použití koncentrace 50 i 5 ng/ml byla produkce IL-6 vyšší než v případě stimulace pomocí LPS (1 µg/ml). Při stimulaci supernatanty ze kmenů K6 a p19A o nejvyšší koncentraci proteinů (50 ng/ml) byla produkce IL-6 také mírně zvýšena. V ostatních případech byla produkce IL-6 nižší než při stimulaci LPS. Koncentrace stimulů korelovala s produkcí IL-6. To poukazuje na to, že kmeny O6K13, K6 a p19A mají nejvyšší schopnost vyvolat zánětlivou reakci.

V případě kultivace bez etoposidu vyšly signifikantní rozdíly mezi kultivací s kmenem O6K13, což vedlo k vysoké produkci IL-6, a kmeny Nissle 1917, LF82 a O83, které naopak produkci IL-6 nepodporovaly. Obecně k nejnižší produkci IL-6 vedla stimulace kmenem O83, který je využíván jako probiotikum.



Graf. č 10: Produkce IL-6 buňkami RAW 264.7 po kultivaci s bakteriálními supernatanty v závislosti na koncentraci stimulu. Hodnoty jsou uvedeny jako procentuelní vyjádření hladiny produkce IL-6 buňkami stimulovanými LPS. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu, zde zaznamenány signifikantní rozdíly mezi kultivací s kmenem O6K13, který vedl k vysoké produkce IL-6, a kmeny Nissle 1917, LF82 a O83, které naopak produkci IL-6 nepodporovaly (* p = 0,05)

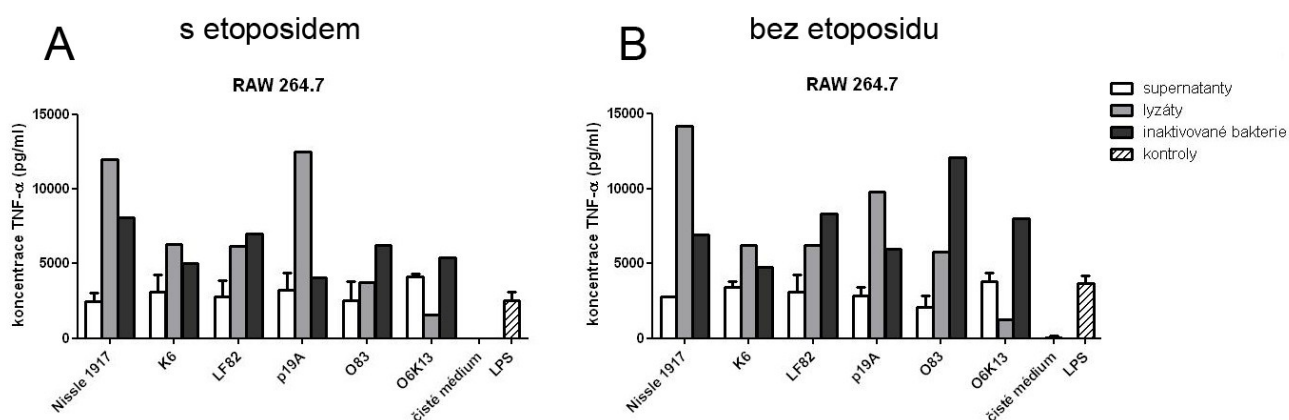
Při kultivaci buněk RAW 264.7 s bakteriálními lyzáty různých kmenů *E. coli* nebyly rozdíly v produkci IL-6 příliš výrazné. Všechny bakterie působily výrazně vyšší produkci IL-6 než čisté buněčné médium, ale zároveň byla produkce často nižší než v případě stimulace LPS (graf č. 11).



Graf. č 11: Produkce IL-6 buňkami RAW 264.7 po kultivaci s bakteriálními lyzáty v závislosti na koncentraci stimulu. Hodnoty jsou uvedeny jako procentuelní vyjádření hladiny produkce IL-6 buňkami stimulovanými LPS. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

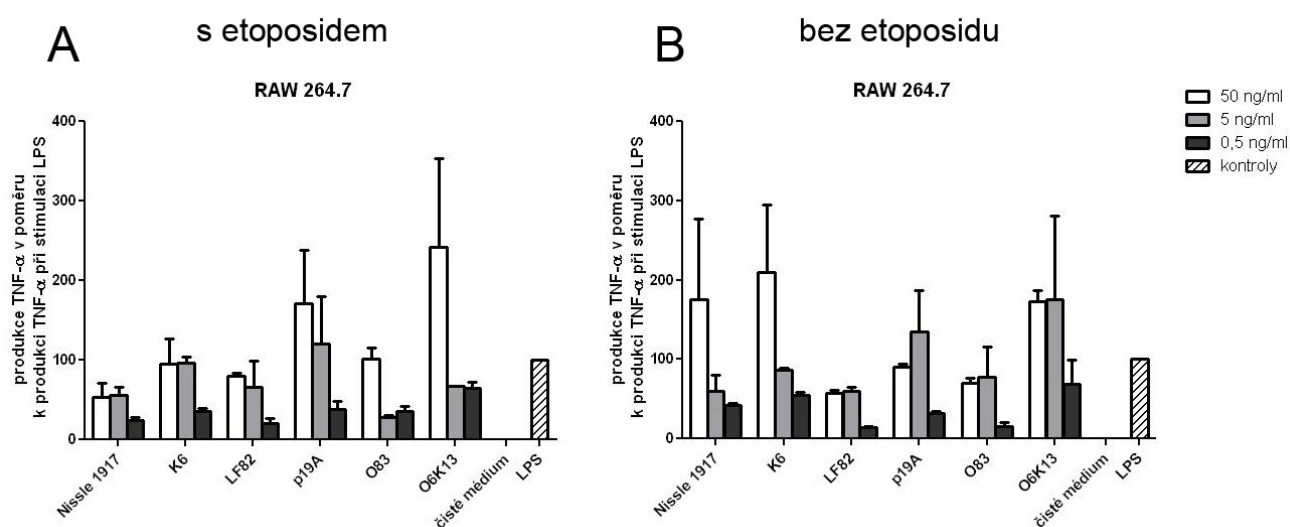
Dále jsem stanovila množství produkovaného TNF- α . Koncentrace produkovaného TNF- α se pohybovala řádově v tisících pg/ml.

Podobně jako v případě IL-6 byla zaznamenána vyšší reakce buněk na stimulaci bakteriálními lyzáty či inaktivovanými bakteriemi než na stimulaci supernatanty z kultivace bakterií. Produkce TNF- α dokonce v těchto případech výrazně převyšovala produkci TNF- α při kultivaci s LPS (graf č. 12).



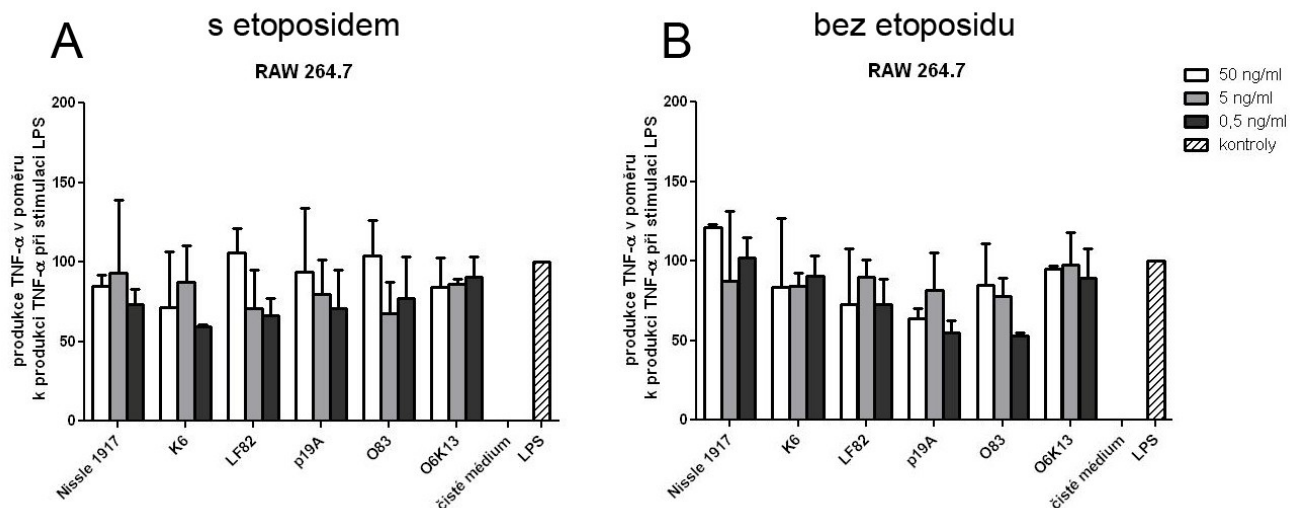
Graf. č 12: Produkce TNF- α buňkami RAW 264.7 v závislosti na stimulaci složkami různých kmenů *E. coli*. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

V případě stimulace RAW 264.7 buněk supernatanty z kultivace bakterií byly pozorovány poměrně významné rozdíly mezi stimulací pouze bakteriálními supernatanty a stimulací kombinovanou s etoposidem. Produkce TNF- α jen částečně korelovala s koncentrací stimulu. Zvýšenou produkcí TNF- α buňky reagovaly na stimulaci kmeny p19A a O6K13 v případě kombinace s etoposidem a na samotnou stimulaci kmeny Nisse 1917, K6, p19A a O6K13. Ovšem žádné z pozorovaných odlišností nejsou významné (vůči sobě ani vůči stimulaci LPS). Při kultivaci buněk s čistým médiem TNF- α nebyl produkován vůbec (graf č. 13).



Graf. č 13: Produkce TNF- α buňkami RAW 264.7 po kultivaci s bakteriálními supernatanty v závislosti na koncentraci stimulu. Hodnoty jsou uvedeny jako procentuelní vyjádření hladiny produkce TNF- α buňkami stimulovanými LPS. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

V případě stimulace RAW 264.7 buněk bakteriálními lyzáty nebyly pozorovány rozdíly v produkci TNF- α v závislosti na koncentraci stimulu, bakteriálním kmenu ani na kombinaci s etoposidem. Produkce TNF- α byla ve všech případech velmi podobná jako při stimulaci LPS (1 μ g/ml). Kontrolní nestimulované buňky ale TNF- α neprodukovaly (graf č. 14).



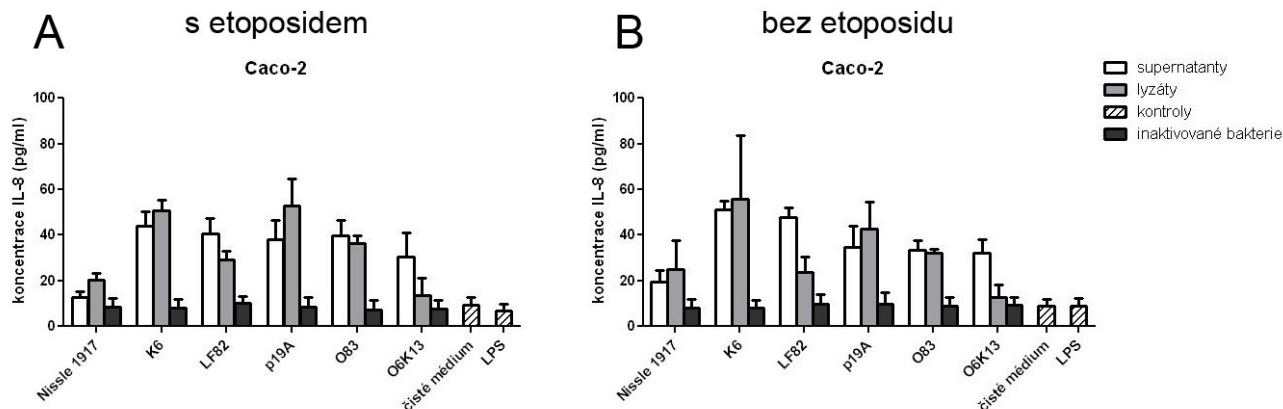
Graf. č 14: Produkce TNF- α buňkami RAW 264.7 po kultivaci s bakteriálními lyzáty v závislosti na koncentraci stimulu. Hodnoty jsou uvedeny jako procentuelní vyjádření hladiny produkce TNF- α buňkami stimulovanými LPS. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

Stejný typ experimentu (hodnocení produkce prozánětlivých cytokinů) jsem prováděla také s lidskými epitelovými buňkami linie Caco-2. U nich byla stanovována produkce cytokinů IL-8, IL-18 a IL-33.

Při žádné stimulaci Caco-2 buňky neprodukovaly IL-18 ani IL-33.

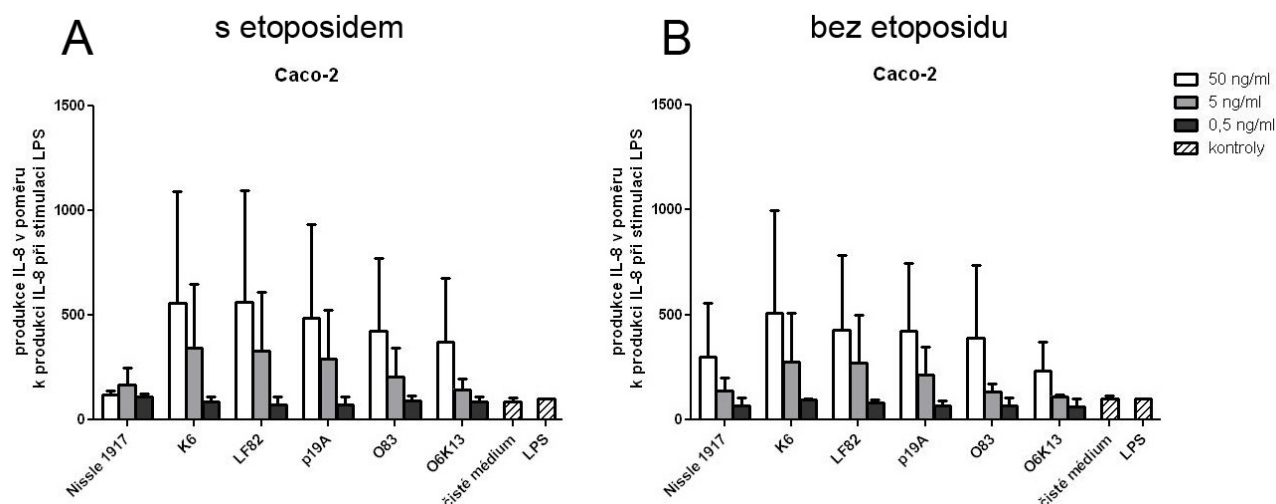
Caco-2 buňky produkovaly po stimulaci pouze IL-8 a i jeho koncentrace se pohybovala v poměrně nízkých hladinách (desítky až stovky pg/ml). Stimulace LPS navíc neměla na produkci IL-8 vliv ani při zvýšené koncentraci (vyzkoušena koncentrace 5 až 100 μ g/ml). Produkce IL-8 buňkami nestimulovanými a buňkami stimulovanými LPS vycházela přibližně stejná.

Stimulace inaktivovanými bakteriemi neměla vliv na produkci IL-8, naopak stimulace bakteriálními lyzáty či supernatanty z kultivace bakterií výrazně zvyšovala produkci IL-8 buňkami. Nejvyšší efekt na produkci IL-8 měla probiotická *E. coli* Nissle (graf č. 15).



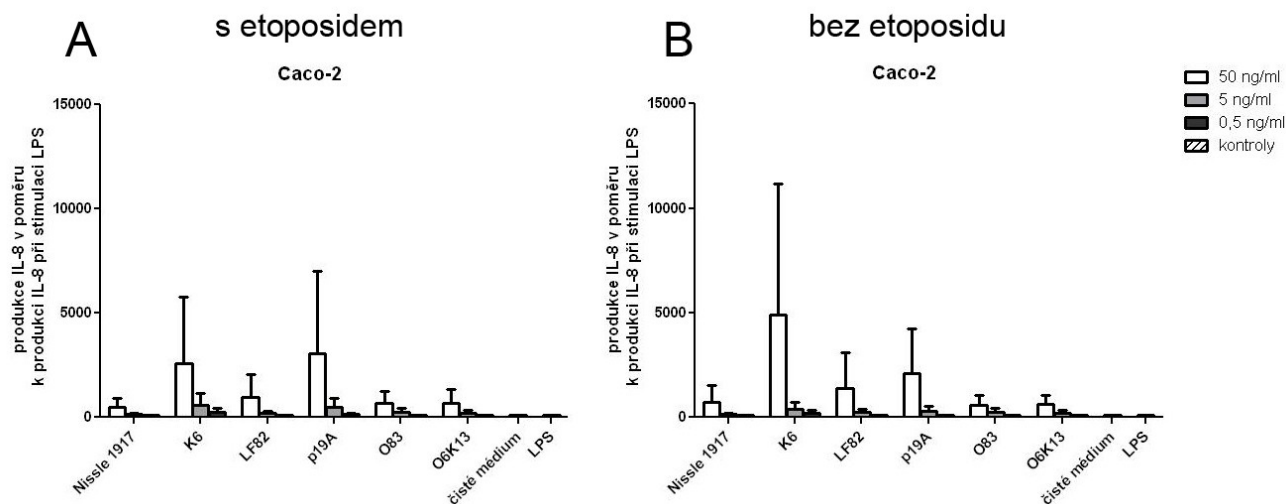
Graf. č 15: Produkce IL-8 buňkami Caco-2 v závislosti na stimulaci složkami různých kmenů *E. coli*. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

V případě stimulace Caco-2 buněk supernatanty z kultivace bakterií byla koncentrace produkovaného IL-8 podobná při stimulaci LPS a nejnižšími koncentracemi bakteriálních supernatantů (koncentrace proteinů 0,5 ng/ml) jako u nestimulovaných buněk. V ostatních případech stimulace byla produkce IL-8 zvýšena. Koncentrace stimulu korelovala s produkcí IL-8. Současná stimulace etoposidem neměla na produkci IL-8 vliv, pouze v případě stimulace *E. coli* Nissle 1917 byly zaznamenána vyšší produkce IL-8 v případě stimulace bez etoposidu (graf č. 16). Statisticky jsem porovnála produkci IL-8 po stimulaci jednotlivými bakteriálními kmeny mezi sebou. V žádném případě nebyl rozdíl signifikantní.



Graf. č 16: Produkce IL-8 buňkami Caco-2 po kultivaci s bakteriálními supernatanty v závislosti na koncentraci stimulu. Hodnoty jsou uvedeny jako procentuelní vyjádření hladiny produkce IL-8 buňkami stimulovanými LPS. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

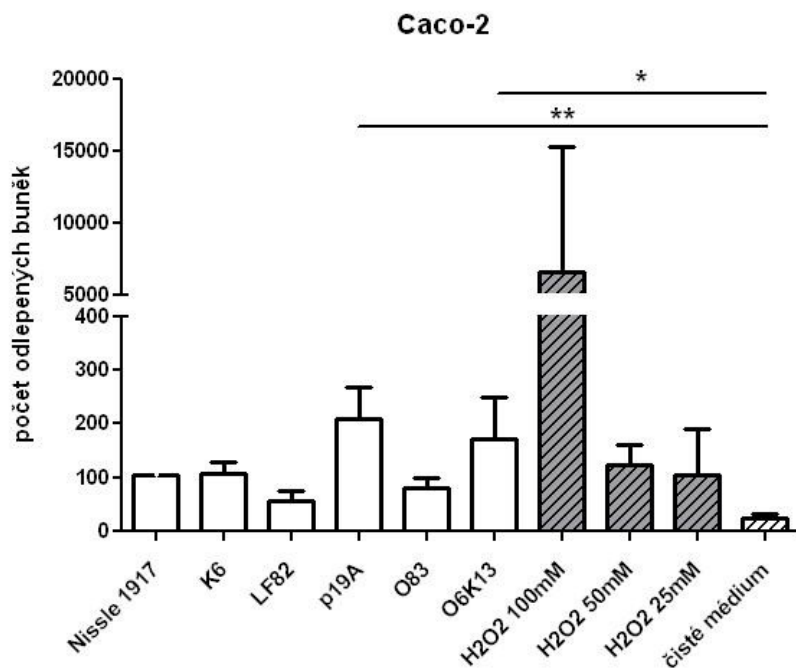
Při stimulaci Caco-2 buněk bakteriálními lyzáty produkce IL-8 korelovala s koncentrací stimulu. Nejvíce byl IL-8 produkován po stimulaci lyzáty *E. coli* kmenů K6 a p19A. V kombinaci s etoposidem byla detekována nejvyšší koncentrace IL-8 při stimulaci kmenem p19A, v případě bez etoposidu tomu bylo naopak. Jako třetí nejvyšší produkce IL-8 byla detekována při stimulaci kmenem LF82. I ostatní kmeny *E. coli* zvyšovaly produkci IL-8 v porovnání s nestimulovanými buňkami nebo buňkami stimulovanými LPS (graf č. 17).



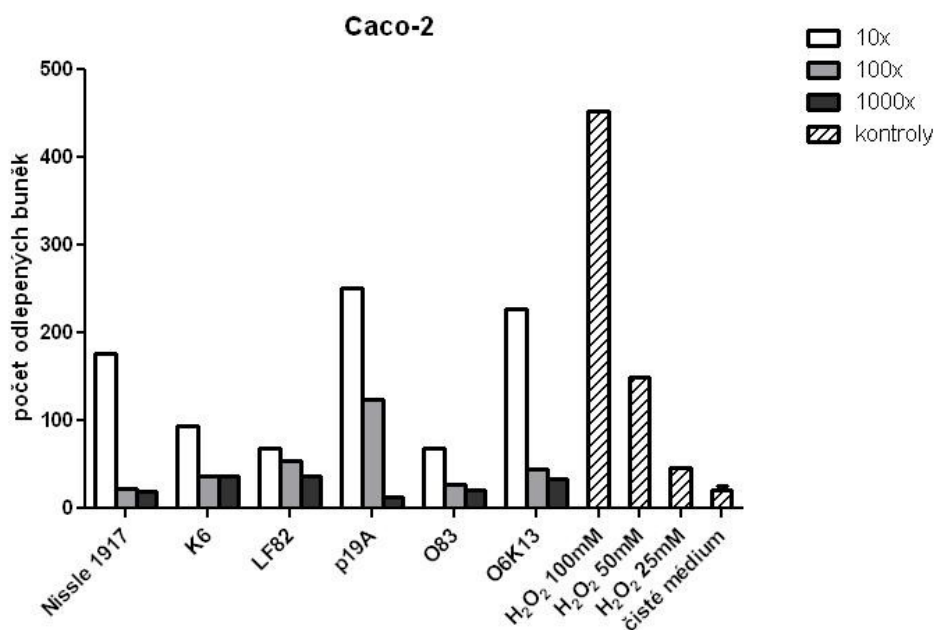
Graf. č 17: Produkce IL-8 buňkami Caco-2 po kultivaci s bakteriálními lyzáty v závislosti na koncentraci stimulu. Hodnoty jsou uvedeny jako procentuelní vyjádření hladiny produkce IL-8 buňkami stimulovanými LPS. a) stimulace kombinovaná s etoposidem, b) stimulace bez etoposidu

5.4. Porušení epitelové vrstvy živými bakteriemi

Jednotlivé kmeny *E. coli* porušovaly epitelovou vrstvu s různou intenzitou. Se snižující se koncentrací živých bakterií klesal počet buněk odloupených z epitelové vrstvy. Jako nejvíce agresivní byly zaznamenány kmeny p19A a O6K13 (grafy č. 18 a 19). Tyto dva kmeny signifikantně zvyšovaly počet odloupených buněk v porovnání s čistým médiem.



Graf. č 18: Vliv živých bakterií (kultivace s bakteriemi ředěnými 10x ze zásobního roztoku o $OD_{600} = 0,5$) na porušení epitelové vrstvy. Graf vyjadřuje počet buněk, které se po kultivaci s živými bakteriemi odloupily z epitelové vrstvy do média. Kmeny p19A a O6K13 signifikantně více porušují epitelovou vrstvu (* $p = 0,05$).



Graf. č 19: Vliv živých bakterií na porušení epitelové vrstvy. Buňky byly kultivovány s jednotlivými kmeny *E. coli* o třech různých koncentracích. Graf vyjadřuje počet buněk, které se po kultivaci s živými bakteriemi odloupily z epitelové vrstvy do média.

6. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo porovnat genotoxické vlastnosti vybraných kmenů bakterie *Escherichia coli* ve vztahu ke střevnímu epitelu a slizniční imunitě. Střevní mikrobiota hraje významnou roli v patogenezi některých onemocnění, jako jsou různé alergie, nespecifické střevní záněty nebo právě kolorektální karcinom. Jako modelový mikroorganismus byla zvolena *E. coli*, díky snadné kultivovatelnosti (jako jedna z mála střevních bakterií může být kultivována v aerobních podmínkách) a výskytu kmenů s různým vztahem k hostiteli (probiotické Nissle 1917 a O83, komenzální K6 i potenciálně patogenní kmeny LF82, p19A a O6K13). Jednotlivé kmeny *E. coli* mají různý vztah ke střevním onemocněním. Proto jsem se zaměřila na jejich vliv na buněčné procesy vedoucí k rozvoji střevních nádorů.

Mnoho studií, které se zabývají vztahem mezi mikrobiotou a kolorektálním karcinomem, je děláno na zvířecích (většinou myších) modelech (Arthur et al. 2014, Klimešová et al. 2013, Veziant et al. 2016 a další). Já jsem však využila *in vitro* model, jehož výhoda spočívá v tom, že je studován pouze přímý vliv mikrobiálních složek na konkrétní typ buněk. Oproti *in vivo* systému má ale nevýhodu v tom, že je výrazně zjednodušen. Nemohli jsme proto sledovat interakce mezi různými buňkami či tkáněmi. Zároveň byly ke kultivaci použity immortalizované buněčné linie. Tato studie sloužila jako pilotní pro zavedení metodik. Později by se mohly další látky mikrobiálního původu testovat na primárních buňkách izolovaných z myší.

Nejprve jsem stanovovala přítomnost genů pro cyklomoduliny u jednotlivých bakteriálních kmenů. Cyklomodulační látky jsou typicky produkovány bakteriemi *E. coli* fylogenetické skupiny B2 (Mirsepasi-Lauridsen et al. 2016). Přítomnost genotoxického ostrůvku *pks* byla detekována ve všech kmenech *E. coli* kromě probiotického kmene O83. Geny pro CNF1 a CNF2 nesou *E. coli* K6, p19A, O83, O6K13 a pravděpodobně také kmen LF82. *E. coli* Nissle 1917 ho neobsahuje. Geny pro CNF3, CDT1 a CDT2 nebyly detekovány u žádného kmene *E. coli*. Jedná se o málo frekventované geny (Dubois 2010), které pravděpodobně vybrané kmeny neobsahují. Případně mohou mít bakterie mutaci v místě nasedání primerů. Také gen pro CIF nebyl detekován u žádného kmene. Na rozdíl od výše zmíněných genů ale dávaly primery pro gen *CIF* PCR produkt. To může být způsobeno ale také špatnou specifitou primerů. Nebo se může gen v genomu bakterií vyskytovat v mutované formě, tudíž PCR má produkt při použití primerů pro *CIF* jinou velikost, než byla očekávaná.

Pro stanovení genotoxických vlastností kmenů *E. coli* a výzkumu jejich vlivu v tumorigenezi CRC byly zvoleny buněčné linie, které byly kultivovány s jednotlivými složkami bakterií. Jednak byla zvolena linie lidských epitelových buněk (Caco-2) jako model střevní sliznice, která hraje důležitou roli v udržení střevní bariéry (Guarner a Malagelade 2003). Z buněk přirozené imunity byly zvoleny makrofágy (myší makrofágová linie RAW 264.7), které hrají důležitou roli ve střevním zánětu (Mariani et al. 2014, Mowat 2003).

Pozorovala jsem jen velmi málo rozdílů v genotoxických účincích mezi jednotlivými kmeny *E. coli*. Vliv na životnost buněk, proliferaci a fosforylaci proteinu p53 nebyl prokázán. Při hodnocení aktivity reparačních mechanismů byla detekována obecně vyšší aktivita při současné kultivaci s etoposidem. Ten jako cytostatikum působí vznik DSB v DNA buněk (Papież et al. 2016). Nebyl ale prokázán efekt stimulace jednotlivými bakteriemi. Jedním z důvodů, proč tomu tak bylo, může být velmi nízká koncentrace bakteriálního stimulu. Pro další experimenty bude tedy nutné připravit stimuly i o vyšší koncentraci.

Mírné rozdíly byly pozorovány při hodnocení vlivu kultivace s jednotlivými kmeny *E. coli* na produkci prozánětlivých cytokinů. Při stimulaci imunitních buněk (linie myších makrofágů RAW 264.7) bakteriálními lyzáty či inaktivovanými bakteriemi jednotlivých kmenů nebyly pozorovány rozdíly v produkci IL-6 nebo TNF- α (podobně jako v experimentech Mirsepasi-Lauridsen et al. 2016). Při stimulaci supernatanty z kultivace bakterií ale docházelo k vyšší produkci IL-6 po kultivaci s kmeny O6K13 a p19A a vyšší produkci TNF- α po kultivaci s kmeny O6K13, p19A, K6 a Nissle 1917. Tato rozdílnost mezi jednotlivými složkami bakterií může být dána např. tím, že bakterie do supernatantu produkují některé stimuly, které se v lyzátech ani inaktivovaných buňkách nevyskytují.

V případě epitelových buněk docházelo ke zvýšení produkce IL-8 v reakci na kultivaci s bakteriálními supernatanty či lyzáty. Produkce byla vyšší než po přidání samotného LPS, proto se zdá, že jsou buňky stimulovány jinými mikrobiálními produkty.

Další experimenty by mohly směřovat k odhalení, které stimuly vedou ke zvýšení zánětlivé odpovědi po stimulaci kmeny *E. coli*.

Také byl testován vliv jednotlivých kmenů na porušení vrstvy epitelových buněk (lidská epitelová linie Caco-2). Nejvýraznější poškození působily kmeny O6K13 a p19A. Z toho lze vyvodit, že mají největší vliv na porušení střevní bariéry ve střevě. Může to být způsobeno přítomností genů pro cyklomoduliny, případně i dalších genů (Dubois et al. 2010, Mirsepasi-Lauridsen et al. 2016).

Obecně vyšší vliv na produkci prozánětlivých cytokinů i na porušení epitelové vrstvy měly bakterie, které obsahovaly více genů pro cyklomoduliny. Dá se proto předpokládat, že produkce cyklomodulačních látek bakteriemi vede k navození lokálního zánětu a porušení bariérové funkce střeva.

Další experimenty ve výzkumu vlivu bakterie *Escherichia coli* na rozvoj kolorektálního karcinomu by se mohly zaměřit na kultivaci bakteriálních složek s primárními buňkami izolovanými z myši. Dále by se mohla zkoumat přítomnost kmenů *E. coli* testovaných v této práci v nádorové tkáni pacientů s CRC.

7. Závěr

Detekovala jsem přítomnost některých genů pro cyklomoduliny, a to *pks* u kmenů Nissle 1917, K6, LF82, p19A a O6K13 a dále CNF1 a CNF2 u kmenů K6, p19A, O83 a O6K13 a pravděpodobně také LF82.

Jednotlivé kmeny *E. coli* nevykazovaly výrazný rozdíl v genotoxických účincích. Nebyl prokázán rozdíl při stimulaci jednotlivými kmeny na životnost či proliferaci buněk, aktivaci reparačních mechanismů ani na fosforylaci proteinu p53 v buňkách. Nebyl pozorován ani rozdíl mezi stimulací jednotlivými bakteriálními složkami.

Mírný vliv měly jednotlivé bakteriální stimuly na produkci prozánětlivých cytokinů. Byla prokázána signifikantně vyšší produkce IL-6 makrofágy po stimulaci supernatantem *E. coli* O6K13 než po stimulaci supernatanty kmenů Nissle 1917, LF82 a O83.

Bakterie *E. coli* O6K13 a p19A signifikantně více poškozovaly epitel oproti kontrolnímu čistému médiu bez bakterií. Rozdíl od ostatních bakterií ale signifikantně prokázán nebyl.

Obecně jsem zaznamenala mírně vyšší genotoxické účinky u bakterií obsahujících více genů pro cyklomoduliny.

Přehled citací

Aktories K, Barbieri JT. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature reviews. Microbiology*. 2005;3(5):397-410. doi: [10.1038/nrmicro1150](https://doi.org/10.1038/nrmicro1150)

Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2005;18(3):133-140. doi: [10.1055/s-2005-916274](https://doi.org/10.1055/s-2005-916274)

Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012;338(6103):120-123. doi: [10.1126/science.1224820](https://doi.org/10.1126/science.1224820)

Arthur JC, Gharaibeh RZ, Mühlbauer M, et al. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nature communications*. 2014;5:4724. doi: [10.1038/ncomms5724](https://doi.org/10.1038/ncomms5724)

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-180. doi: [10.1038/nature09944](https://doi.org/10.1038/nature09944)

Beets G, Sebag-Montefiore D, Andritsch E, Arnold D, et al. ECCO Essential Requirements for Quality Cancer Care: Colorectal Cancer. A critical review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;110:81-93. doi: [10.1016/j.critrevonc.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.12.001)

Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):18933-18938. doi: [10.1073/pnas.1007028107](https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107)

Blazkova H, Krejcikova K, Moudry P, Frisan T, Hodny Z, Bartek J. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(1-2):357-367. doi: [10.1111/j.1582-4934.2009.00862.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00862.x)

Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-2087.e3. doi: [10.1053/j.gastro.2009.12.064](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064)

Boudeau J, Glasser A-L, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. Orndorff PE, ed. *Infection and Immunity*. 1999;67(9):4499-4509.

Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. I. 2008;1(1):31-7. doi: [10.1038/mi.2007.9](https://doi.org/10.1038/mi.2007.9)

Camp JG, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Patterns and Scales in Gastrointestinal Microbial Ecology. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1989-2002. doi: [10.1053/j.gastro.2009.02.075](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.075)

Casadevall A, Pirofski LA. Microbiology: Ditch the term pathogen. *Nature*. 2014;516(7530):165-6. doi: [10.1038/516165a](https://doi.org/10.1038/516165a)

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81. doi: [10.1093/carcin/bgp127](https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127)

Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(25):11537-11542. doi: [10.1073/pnas.1001261107](https://doi.org/10.1073/pnas.1001261107)

Dalmaso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes*. 2014;5(5):675-680. doi: [10.4161/19490976.2014.969989](https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969989)

- Das V, Kalita J, Pal M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2017;87:8-19. doi: [10.1016/j.biopha.2016.12.064](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064)
- Davenport ER, Mizrahi-Man O, Michelini K, Barreiro LB, Ober C, Gilad Y. Seasonal Variation in Human Gut Microbiome Composition. Quintana-Murci L, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90731. doi: [10.1371/journal.pone.0090731](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090731)
- DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*. 2011;12(2):169-85. doi: [10.1017/S1466252311000193](https://doi.org/10.1017/S1466252311000193)
- Dubois D, Delmas J, Cady A, et al. Cyclomodulins in Urosepsis Strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(6):2122-2129. doi: [10.1128/JCM.02365-09](https://doi.org/10.1128/JCM.02365-09)
- Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C. *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1): Toxin Biology, *in Vivo* Applications and Therapeutic Potential. *Toxins*. 2010;2(2):283-296. doi: [10.3390/toxins2020283](https://doi.org/10.3390/toxins2020283)
- Gagnaire A, Nadel B, Raoult D, et al. Collateral damage: insights into bacterial mechanisms that predispose host cells to cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(2):109-128. doi: [10.1038/nrmicro.2016.171](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.171)
- Gagnière J, Raisch J, Veziat J, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(2):501-518. doi: [10.3748/wjg.v22.i2.501](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501)
- García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *Journal of medical microbiology*. 2016;65(12):1347-1362. doi: [10.1099/jmm.0.000371](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000371)
- Graillot V, Dormoy I, Dupuy J, et al. Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016;6:34. doi: [10.3389/fcimb.2016.00034](https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00034)
- Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(1):3-22. doi: [10.1016/j.jaci.2009.05.038](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038)
- Guarner F, Malagelade JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361(9356):512-9. doi: [10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
- Haggar FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2009;22(4):191-197. doi: [10.1055/s-0029-1242458](https://doi.org/10.1055/s-0029-1242458)
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: [10.1016/j.cell.2011.02.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013)
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hein AL, Ouellette MM, Yan Y. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (Review). *International Journal of Oncology*. 2014;45(5):1813-1819. doi: [10.3892/ijo.2014.2614](https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2614)
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2014;11(8):506-14. doi: [10.1038/nrgastro.2014.66](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66)

- Hsu Y, Jubelin G, Taieb F, Nougayrède JP, Oswald E, Stebbins CE. Structure of the Cyclomodulin Cif from Pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*. 2008;384(2):465-477. doi: [10.1016/j.jmb.2008.09.051](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.051)
- Hudcovic T, Stepánková R, Kozáková H, Hrnčíř T, Tlaskalová-Hogenová H. Effects of monocolonization with *Escherichia coli* strains O6K13 and Nissle 1917 on the development of experimentally induced acute and chronic intestinal inflammation in germ-free immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia microbiologica*. 2007;52(6):618-26.
- Choi W, Yeruva S, Turner JR. Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Experimental cell research*. 2017;pii: S0014-4827(17)30157-X. doi:[10.1016/j.yexcr.2017.03.036](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.036)
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-2058. doi: [10.1053/j.gastro.2010.01.054](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054)
- Jinadasa RN, Bloom SE, Weiss RS, Duhamel GE. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. Ball AS, ed. *Microbiology*. 2011;157(Pt 7):1851-1875. doi: [10.1099/mic.0.049536-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.049536-0)
- Kich DM, Vincenzi A, Majolo F, Volken de Souza CF, Goettert MI. Probiotic: effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention. *Nutricion hospitalaria*. 2016;33(6):1430-1437. doi: [10.20960/nh.806](https://doi.org/10.20960/nh.806)
- Klimesova K, Kverka M, Zakostelska Z, et al. Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M deficient mice. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(6):1266-1277. doi: [10.1097/MIB.0b013e318281330a](https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318281330a)
- König J, Wells J, Cani PD, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7(10):e196. doi: [10.1038/ctg.2016.54](https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54)
- Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo*. 2008;22(3):305-9.
- Landberg G, Roos G. Flow cytometric analysis of proliferation associated nuclear antigens using washless staining of unfixed cells. *Cytometry*. 1992;13(3):230-40. doi: [10.1002/cyto.990130304](https://doi.org/10.1002/cyto.990130304)
- Lao VV, Grady WM. Epigenetics and Colorectal Cancer. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(12):686-700. doi: [10.1038/nrgastro.2011.173](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173)
- Lodinová-Zádníková R, Prokesová L, Kocourková I, Hrdý J, Zizka J. Prevention of allergy in infants of allergic mothers by probiotic *Escherichia coli*. *International archives of allergy and immunology*. 2010;153(2):201-6. doi: [10.1159/000312638](https://doi.org/10.1159/000312638)
- Lukáš M. *Escherichia coli* (Escherichia coli kmen Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1) jako probiotikum v klinické praxi. *Remedia*. 2003
- Marchès O, Ledger TN, Boury M, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Molecular microbiology*. 2003;50(5):1553-67
- Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(29):9716-9731. doi: [10.3748/wjg.v20.i29.9716](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9716)
- Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. Cho WC, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(1):197. doi: [10.3390/ijms18010197](https://doi.org/10.3390/ijms18010197)

- Martin OCB, Frisan T, Mihaljevic B. Bacterial genotoxins as the interphase between DNA damage and immune response. *Microbial toxins*. 2016;1-20
- McGhee JR, Fujihashi K. Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biology*. 2012;10(9):e1001397. doi: [10.1371/journal.pbio.1001397](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397)
- Mirsepasi-Lauridsen HC, Du Z, Struve C, et al. Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2016;7(3):e149-. doi:10.1038/ctg.2016.3.
- Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Seminars in cancer biology*. 2016;37-38:51-64. doi: [10.1016/j.semcancer.2016.03.003](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.003)
- Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews. Immunology*. 2003;3(4):331-41. doi: [10.1038/nri1057](https://doi.org/10.1038/nri1057)
- Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(2):557-566. doi: [10.3748/wjg.v22.i2.557](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.557)
- Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006;313(5788):848-51. doi: [10.1126/science.1127059](https://doi.org/10.1126/science.1127059)
- Ohno H. Intestinal M cells. *Journal of Biochemistry*. 2016;159(2):151-160. doi: [10.1093/jb/mvv121](https://doi.org/10.1093/jb/mvv121)
- Oswald E, Nougayrède JP, Taieb F, Sugai M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Current opinion in microbiology*. 2005;8(1):83-91. doi: [10.1016/j.mib.2004.12.011](https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.011)
- Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathology Research International*. 2012;2012:509348. doi: [10.1155/2012/509348](https://doi.org/10.1155/2012/509348)
- Papież MA, Krzyściak W, Szade K, et al. Curcumin enhances the cytogenotoxic effect of etoposide in leukemia cells through induction of reactive oxygen species. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10:557-570. doi: [10.2147/DDDT.S92687](https://doi.org/10.2147/DDDT.S92687)
- Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2059-2072. doi: [10.1053/j.gastro.2009.12.065](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065)
- Quigley EMM. Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterology & Hepatology*. 2013;9(9):560-569.
- Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development*. 2007;21(20):2525-38. doi: [10.1101/gad.1593107](https://doi.org/10.1101/gad.1593107)
- Samba-Louaka A, Nougayrède J-P, Watrin C, Oswald E, Taieb F. The Enteropathogenic *Escherichia coli* Effector Cif Induces Delayed Apoptosis in Epithelial Cell. *Infection and Immunity*. 2009;77(12):5471-5477. doi: [10.1128/IAI.00860-09](https://doi.org/10.1128/IAI.00860-09)
- Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and applied biochemistry*. 1999;29 (Pt 2):99-108.
- Sears CL, Garrett WS. Microbes, Microbiota and Colon Cancer. *Cell host & microbe*. 2014;15(3):317-328. doi: [10.1016/j.chom.2014.02.007](https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007)
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 2016;164(3):337-40. doi: [10.1016/j.cell.2016.01.013](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013)

Shawki A, McCole DF. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2017;3(1):41-50. doi: [10.1016/j.jcmgh.2016.10.004](https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.10.004)

Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2013;13(11):800-812. doi: [10.1038/nrc3610](https://doi.org/10.1038/nrc3610)

Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009;21:122–158.

Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2012;12(10):709-20. doi: [10.1038/nrc3344](https://doi.org/10.1038/nrc3344)

Tözün N, Vardareli E. Gut microbiome and gastrointestinal cancer: Les liaisons dangereuses. *Journal of clinical gastroenterology*. 2016;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S191-S196., doi: [10.1097/MCG.0000000000000714](https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000714)

Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(29):9828-9849. doi: [10.3748/wjg.v20.i29.9828](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9828)

Veziat J, Gagnière J, Jouberton E, et al. Association of colorectal cancer with pathogenic *Escherichia coli*: Focus on mechanisms using optical imaging. *World Journal of Clinical Oncology*. 2016;7(3):293-301. doi: [10.5306/wjco.v7.i3.293](https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i3.293)

Welch RA. Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. *Microbiology spectrum*. 2016;4(3):10.1128/microbiolspec.UTI-0011-2012. doi: [10.1128/microbiolspec.UTI-0011-2012](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0011-2012)

Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(18):10452-10459. doi: [10.1073/pnas.1734063100](https://doi.org/10.1073/pnas.1734063100)

Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, et al. Lysate of Probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 Ameliorates Colitis by Strengthening the Gut Barrier Function and Changing the Gut Microenvironment. Ryffel B, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27961. doi: [10.1371/journal.pone.0027961](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027961)

další zdroje:

projekt GLOBOCAN, 2012, <http://globocan.iarc.fr/>

SVOD (Systém pro vizualizaci onkologických dat), databáze Národního onkologického registru (NOR), www.svod.cz