MIKROBIOMNOVINY

Informační servis

České mikrobiomové společnosti ČLS JEP, z.s.

Motto měsíce:

"Microbial marvels: Your go-to source for the latest discoveries and developments in the fascinating world of microbes."

ChatGPT na téma Mikrobio(m)noviny (pokyn zněl „Navrhni motto pro informační zpravodaj mikrobiomové společnosti")

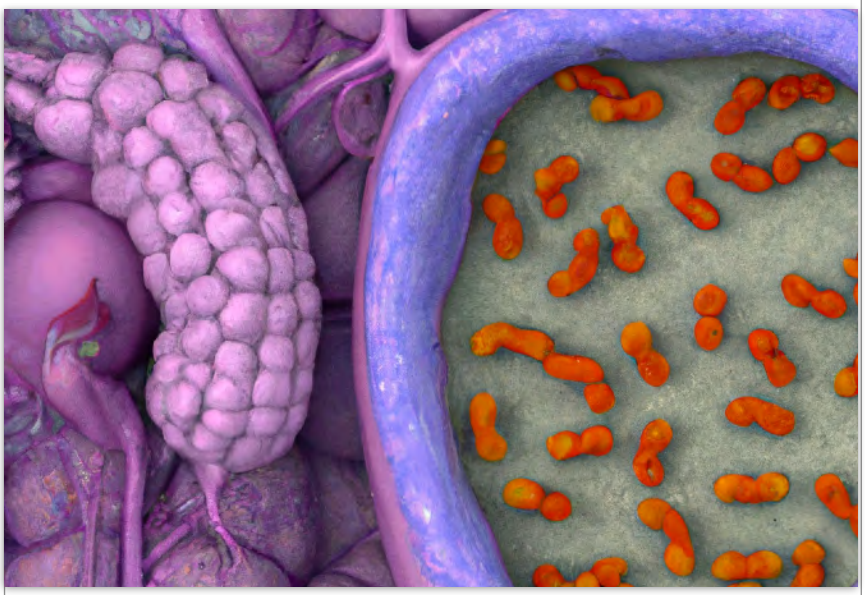
Upozornění na akce:

Přednášky v Městské knihovně Praha
Úspěšný cyklus seminářů pro veřejnost v Městské knihovně pokračuje již druhým rokem, letos ale začínáme v 19.00 hodin. A nezapomeňte, pokud nějakou přednášku nestihnete naživo, najdete ji cca o 2 měsíce později na youtube kanálu MKP a na našich stránkách.

5.4. nám Klára Doubková nastínila perspektivy mikrobiomu ve forenzní analýze.

Do prázdnin nás pak ještě čeká:

3. 5. 2023 Máme kus duše i ve střevech? Prof. MUDr. Cyril Höschl, DrSc. FRCPsych.



Editorial

Milí přátelé,

Opravdu Vás nešálí zrak, i my jdeme s dobou a zkusili jsme si pohrát s nejnovějšími výdobytky IT světa. Vzhledem k tomu, že se termín pro dodání hlavního článku kryl s termínem odevzdávání grantových žádostí, začala jsem lehce panikařit – a požádala pro jistotu o záložní text ChatGPT („write 2 pages about urinal microbiome") .... Konec konců, byl APRÍL, tak proč ne.

Když ovšem autorka hlavního tématu dr. Andrea Palyzová zjistila, čemu konkuruje, dokázala nemožné a text raději rychle napsala sama. Proto si za ním opravdu můžeme stát. Ten od chatbota byl až strašidelně uvěřitelný - jen škoda, že si reference prostě vymyslel a pokud v nějakém místě potřeboval název bakterie, tak tam dal název jakékoli bakterie bez vazby k reálnému stavu poznání. Tento text Vám tedy raději nabízet nebudeme. Abyste o tu zábavu ale nepřišli úplně, požádala jsem ChatGPT o motto dnešního vydání a Dall-E2 o pár tematických obrázků. Ač se svět IT řítí nezadržitelně kupředu, v našem oboru budeme muset ještě dlouho vystačit s lidským mozkem. Také AI rozhodně nenahradí hřejivé obrázky Míši Bartoňové! Budeme Vám tedy i nadále nabízet BIO-noviny, produkované lidmi a pro lidi.

Upozornění na akce:

7. 6 2023 Seminář na téma Mikrobiom a mentální anorexie.
Prof. Hana Papežová, CSc .

15.6. od 10:00 Malý sál
Městská knihovna
Jak spolu stromy mluví
Představení - Mikrobiom a prostředí - houby a lesní sítě.
Info ZDE

Akce ke Světovému dni mikrobiomu

27.6. 2023 pro Vás pořádáme v pražské FN Motol odpolední odborný seminář na téma „Mikrobiom a nádorová onemocnění" (Prof. MUDr. Petra Tesařová, CSc., Prof. RNDr. Michal Masařík, Ph.D. a Prof. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.).

Součástí programu bude také představení projektu Dárcovské banky stolice za kterou mimo jiné stojí MUDr. Jiří Vejmelka z naší redakční rady, a slavnostní křest skvělé knihy V. Sojky o kvašení a kvašených potravinách. Program se ještě ladí, pozvánky dostanete e-mailem a včas je umístíme i na naše stránky do sekce Aktuality

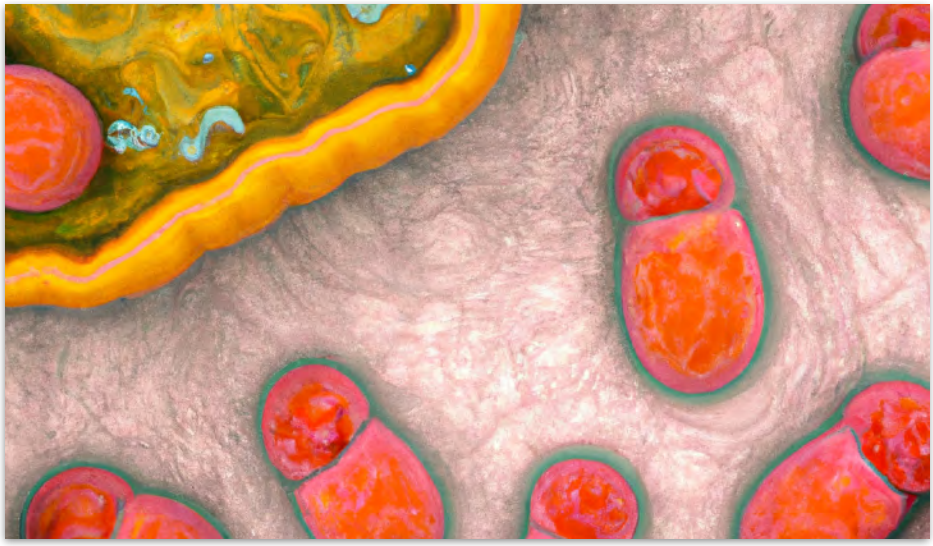
V neděli předtím, tedy **25.6.2023** Vás zveme na rodinné odpoledne do zcela výjimečného **Muzea historických nočníků a toalet** v Praze 12 kde chystáme program ve spolupráci se **Zkvašeno.cz**. Můžete se těšit na novou knihu a diskusi s autorem, workshop kvašení zeleniny vhodný i pro děti, kvíz o ceny a po celou dobu možnost konzultovat s odborníky z ČMS své mikrobiomové otázky. Podrobnosti budou včas zveřejněny na našem webu.

V tomto čísle Vám přinášíme novinky o mikrobiomu močových cest, který je v porovnání se střevním nebo kožním tak trochu Popelkou, povídání s Vláďou Sojkou z webu Zkvašeno.cz o jejich nové knize, první čtenářský příspěvek do kuchyňského okénka (hned zcela inovátorský) z autorské dílny našeho čtenáře Jakuba Cahy a samozřejmě obvyklou porci pozvánek na akce.

Určitě se podívejte také na naše vylepšené webové stránky! Kromě celkového faceliftu jsme velmi podstatně vylepšili naše stanoviska , objevila se nová sekce FAQ , tedy často kladených otázek, a nově máme také sekci Podcasty. Tam najdete jak naše vlastní videopodcasty, které natáčíme ve spolupráci s Meditorial, tak podcasty spřátelených médií, kam byli naši členové pozváni.

Přejeme Vám inspirativní čtení, příjemné jaro a budeme se těšit na viděnou, například na některé z našich akcí ke Světovému dni mikrobiomu.

Téma měsíce: Mikrobiom v močových cestách



Moderní pohled prostřednictvím sekvenačních technologií nové generace (NGS) umožnil charakterizovat mikrobiom močového traktu a vedl k revizi dříve obecně akceptovaného konceptu sterility močového měchýře. Nejen, že se mikrobiální komunita v močovém traktu podílí na zachování zdraví jedince, ale změny v jejím složení bývají často spjaty s funkčními poruchami urogenitálního traktu (symptomy dolních močových cest, neurogenní měchýř, urgentní inkontinence a chronická renální insuficience), syndromem chronické pánevní bolesti, cystitidou, a dokonce i s nádory močového měchýře. Díky detailnímu studiu močového mikrobiomu u zdravých jedinců a jeho role v rozvoji infekcí močových cest oportunními patogeny se otevřel nový studijní obor zaměřený na prevenci, diagnostiku a strategie léčby patologií močového traktu.

Současným zlatým standardem pro diagnostiku mikroorganismů v moči je jejich kultivace na diagnostických mediích, implementovaná do laboratoří klinické mikrobiologie. Nicméně, tato metoda umožnuje detekci pouze omezeného počtu mikroorganismů. Musí se jednat o mikroorganismy kultivovatelné a je s výhodou, pokud jsou zastoupeny v dostatečně vysokém množství. Především se jedná o rychle rostoucí fakultativně anaerobní a aerobní bakterie jako je *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus, S. saphrophyticus* a *Streptococcus agalactiae* (Monsen et al., 2015). Vedle této standardní mikrobiologické metody je dalším nástrojem identifikace bakterií vysokorozlišovací analytická technika hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS). Tato technika je s úspěchem aplikovatelná nejenom při identifikaci klinických kmenů, jejichž rodové či druhové určení je obtížné zjistititelné standardními kultivačními a biochemickými metodami, ale může i prostřednictvím charakterizace jednotlivých komponent proteomu detekovat řadu biomarkerů virulence, které jsou pro daný mikroorganismus jedinečné. Skutečný přelom ovšem znamenalo až výše zmíněné využití NGS.

Dle dosavadních poznatků získaných metodou NGS je mikrobiom moči tvořen rozmanitou škálou aerobních a anaerobních bakterií. Celkem bylo z moči identifikováno devět bakteriálních kmenů, z nichž 4 jasně dominují: *Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroides a Actinobacteria.* V souvislosti s urogenitálním systémem bylo doposud popsáno 562 různých bakteriálních druhů náležejících do 210 rodů a představujících 24,4 % prokaryotické diverzity lidského organismu (Hrbáček et al., 2021). V závislosti na pohlaví jedince a povaze onemocnění močového traktu (nádorové či benigní onemocnění, funkční poruchy atd.) se mikrobiom liší druhovou skladbou a zastoupením rodů. Stejně jako v případě dalších mikrobiálních společenstev, i mikrobiom močových cest ovlivňují hormonální změny jako např. menopauza nebo naopak zahájení menstruačního cyklu. U zdravých jedinců mužského pohlaví ovlivňuje taxonomické složení urinálního mikrobiomu navíc ještě třeba sexuální aktivita, kdy může být dolní část močové trubice osídlena mikrobiomem typickým typickým pro bakteriální vaginózu, jak hezky shrnuje review Whiteside a kol., 2015.

U 60 % žen dominuje rod *Lactobacillus*, u 22 % rod *Gardnerella*, u ostatních se vyskytuje směs několika rodů bez zjevného dominantního zastoupení, jako jsou *Corynebacterium, Streptococcus, Actinomyces a Staphylococcus*. Mužský mikrobiom, který byl doposud detailně méně prostudován, je tvořen dominantními rody jako *Staphylococcus*, *Streptococcus* a případně *Corynebacterium*, *Prevotella* a *Pseudomonas*, (Hilt et al., 2014 ; Hrbáček et al., 2021). Zaměříme-li se na funkční poruchy močového měchýře např. syndrom hyperaktivního močového měchýře, vidíme spojitost s přítomností nejčastěji se vyskytujících rodů, jako jsou *Lactobacillus, Corynebacterium, Streptococcus, Actinomyces* a *Staphylococcus*. Různé projevy ženské inkontinence bývají spojeny s redukcí celkové abundance rodu *Lactobacillus* a naopak zvýšením zastoupení rodu *Gardnerella*, u mužů byly ve zdraví identifikovány převažující rody *Lactobacillus*, *Streptococcus, Corynebacterium a Escherichia,* zatímco u pacientů s inkontinencí byl mnohem variabilnější mikrobiom zahrnující *Dialister*, *Gemella*, *Streptococcus*, *Sneathia, Prevotella, Aerococcus, Veillonella*, a *Atopobium* (viz review Aragón a kol., 2018). U mužů trpících chronickou prostatitidou byl oproti kontrolám zaznamenán značný nárůst počtu dominantních taxonů (17 oproti 5).

Alterovaný mikrobiom byl prokázán také u pacientů s uroonkologickými onemocněními. Konkrétně např. u mužů z karcinomem prostaty bylo oproti zdravým kontrolám detekováno významně vyšší zastoupení rodů *Acinetobacter, Anaerococcus, Rubrobacter, Sphingobacterium, Atopostipes a Geobacillus* (Wu et al., 2018), přičemž gram negativní bakterie rodu *Acinetobacter* byly v minulosti asociovány i s nádory močového měchýře u skotu.

V případě zdravých jedinců bylo zcela zavrženo dogma sterilní moči, jelikož u nich byly detekovány dominantní rody *Lactobacillus, Prevotella a Gardnerella* (Siddiqui et al., 2011). Ačkoli některé z těchto mikroorganismů řadíme mezi oportunní patogeny a jejich převaha může vést k vývoji infekcí močových cest, většina z nich je považována za neškodné a pravděpodobně hraje prospěšnou roli při

udržování stabilního zdravého prostředí močových cest. S největší pravděpodobností bude i v močových cestách hrát opět roli stará známá kolonizační rezistence.

Klinický význam stanovení detailního složení močového mikrobiomu souvisí právě s charakterizací vývoje akutní či chronické infekce vyvolané mikroorganismy, od kolonizace sliznice komenzálními bakteriemi (v koncentraci $10^1 - 10^4$ CFU/ml) až po invazivitu virulentních kmenů do prostředí močového měchýře. Detailní analýza mikrobiomu nám umožní určit, zda se jedná o eubiózu nebo naopak dysbiózu močového traktu.

A na závěr jedna zajímavost z blízkého sousedství - střevní bakterie *Oxalobacter formigenes* je úzce spojena s velmi známým onemocněním urogenitálního traktu, tzv. ledvinovými kameny. *O. formigenes* je ve střevě odpovědný za degradaci oxalátu z potravy. Přítomnost této bakterie znamenala až 70% snížení rizika vzniku ledvinových kamenů a dokonce se začala testovat možnost využít *O. formigenes* jako probiotickou profylaxi ledvinových kamenů (Kaufman 2008; Hiremath a kol., 2022).

Medailonek

RNDr. Andrea Palyzová Ph.D. vystudovala PřF UK v Praze, obor Mikrobiologie a molekulární genetika a v současné době pracuje jako vědecký pracovník v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i., kde se dlouhodobě věnuje studiu fyziologie a morfologie patogenních mikroorganismů vyskytujících se v organizovaných společenstvech kolonizujících přirozený ekosystém se zaměřením na produkci sekundárních metabolitů s aplikačním potenciálem v oblasti lékařské mikrobiologie a biotechnologie.

Upozornění na mezinárodní akce:

Velký výběr mezinárodních konferencí s mikrobiomovou tematikou naleznete zde

Za zmínku stojí

5. - 9. 6. 2023 ONLINE SYMPOZIUM "**Living a Microbial World**". Registrace zdarma ! Info ZDE

Konference Future Microbiome konaná **26.-27.6.2023 v Bostonu, USA**, nabízející méně častá témata jako „Lidský mikrobiom jako zdroj bioaktivních látek" nebo „Nové techniky pro identifikaci interakcí v mikrobiomu".

KNIŽNÍ OKÉNKO

Dnes můžeme naše okénko považovat za vysloveně sváteční. Přinášíme Vám rozhovor s autorským tandemem Vláďou Sojkou a Zuzkou Ouhrabkovou, kteří už jedenáctým rokem připravují web zkvašeno.cz o domácí přípravě nejrůznějších fermentovaných potravin a pochutin z celého světa. Vláďa a Zuzka právě dokončují knihu ZKVAŠENO - kuchařka na doma, kterou jsme ve výboru společnosti měli tu čest číst jako „beta“ čtenáři. Všichni bez rozdílu jsme byli nadšeni. Už vymýšlíme, jak spojíme oslavy Světového dne mikrobiomu 27. 6. 2023 s křtem knihy. A Vám teď chceme nabídnout malé nahlédnutí „pod pokličku“ přímo od autora:

Vláďo, můžeš nám připravovanou knihu představit?

S nabídkou přišlo nakladatelství Jota a dalo nám úplnou volnost v tom, co by mělo být na dané téma zpracováno. Nebylo to úplně jednoduché, protože kuchařek, příčetných knížek o vcelku relevantní zdravé výživě či fermentaci už je na českém trhu několik a počet ostrým tempem roste, tak jsme nechtěli opakovat to, co už bylo mnohokrát napsáno. Zvolili jsme taktiku vložit do knihy to, co každý z nás v redakci už několik let žije, co nám chutná a co považujeme za vhodné k pravidelné konzumaci, doprovozeno kontextem a zastřešeno poznatky výživových specialistů a mikrobiologů. V úvodu vysvětluji, proč a jak je super jíst každý den co nejvíce druhů vlákniny, poté se přesouváme k návodům na užitečné fermenty z oblasti zeleniny, luštěnin, mléka a nápojů a nakonec Zuzka, coby zkušený rešeršér, sází jeden recept bohatý na vlákninu a fermentované suroviny za druhým. Hlavní poslání zní: levné základní suroviny, které může mít každý doma, hodně vlákniny, festival chutí a krátký čas na přípravu samotného pokrmu.

Co Tebe a Zuzku přivedlo ke kvašení takového rozměru?

V: U mě to byl určitě souběh několika faktorů, z nichž většina má kořeny už v mém dětství: láska k originálnímu a pestrému jídlu, touha psát a popularizovat a v neposlední řadě tendence odjakživa 'bejt tak trochu divnej'. Když pomalu končilo období gastronomického temna po roce 2010, objev fermentace s nepřebernou paletou chutí, vůní a textur skýtal příležitost v životě začít dělat zase něco nového a naplňujícího.

Z: Polský boršč z řepného kvasu. A snaha si ho vyrobit doma, což vedlo k tomu, že jsem si přečetla Sandora Katze a jeho Wild Fermentation a byla jsem ztracená. Další hypotéza říká, že si mě z té řepy osídlili mikrobové, kteří nyní skrze osu střevo-mozek chtějí, aby si více a více lidí osídlilo svoje střeva jejich kulturou!

Je nějaká kvašená potravina, kterou jste ještě nezkusili? Nebo nějaká, která Vás třeba pořádně pozlobila?

Z: Pořád na mě čekají skandinávské alkalicky kvašené ryby, paryby a ovčí hlavy a strašně moc dálněvýchodních dobrot, o kterých ještě ani nevím, že existují. Nespolupracuje se mnou velmi často právě třeba řepa, protože velmi ráda chytá křís, nebo slizovatí.

V: V základu jsem ochutnal anebo připravuji skoro ze všech oblastí domácí přípravy fermentů aspoň něco krom alkoholů, ale manko u těch severských putridně zapáchajících ryb máme se Zuzkou stejné. Ne že bych se nějak zvlášť obával, ono moje řádně rozklížené tofu také umí odehnat pěkných pár zvědavců, ale nedává mi smysl jíst tak těžko dostupné nelokální výrobky, na které se nedají ani moc sehnat suroviny (a navíc to není na každodenní jídlo). Co však soustavně trápí mne, je příprava dobrých plných octů. Ty se mi v malém množství v domácnosti prostě nedaří a rozhodně mě s nimi v příštích dekádách čeká ještě mnoho osobního vyřizování.

Kdy bude kniha na pultech knihkupectví?

Plán je vyjít na začátku letošního června, tak se snad nepokazí nic ve výrobě a při alokaci papíru v tiskárně. Moc rádi bychom přivítali letošní Světový den mikrobiomu 27. června právě křtem.

Otázka, na kterou byste rádi odpověděli, a nikdo se zatím ještě nezeptal?

Z: Kdo byl nejlepší český šlechtic a proč právě František Antonín Špork a Jindřich z Lipé. Ale to je spíš někam jinam a na strašně dlouho.

V: Proč je tak strašně super mít doma, v práci, i na veřejných toaletách k dispozici podnožku. Jsme chodící a velmi důmyslný fermentor a z nějakého podivného důvodu děláme v posledních několika stovkách let v civilizovaném světě vše pro to, aby výstupní produkt, čili stolice, odcházel z našeho trávicího ústrojí s překážkou fyziologicky nesprávného sezení s nohama svírajícíma s tělem pravý úhel. Podnožka na každé toaletě zpříjemní každý den! I toto téma patří ke stravování a zdravému životnímu stylu plnému vlákniny a mikroutů!

Metodické okénko aneb proč o střevním mikrobiomu stále h...o, pardon, STOLICI víme

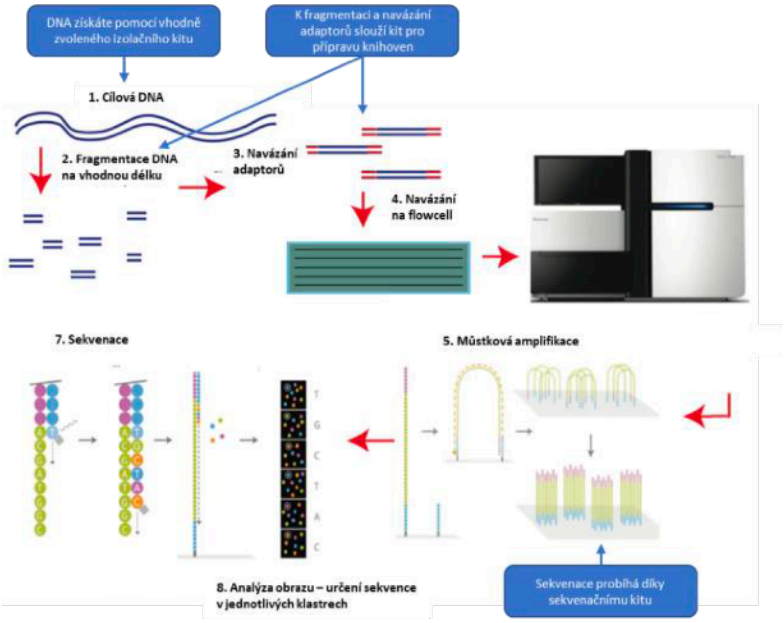
A je to tady. Hromady práce a teorie za námi. Máme kýženou DNA. Máme vybranou cestu, kterou půjdeme po stopách bakterií ve vzorku. A konečně se přibližujeme k tomu hranatému zázraky konajícímu přístroji, který pomohl změnit svět. Že přeháním? Možné to je. Ale i škarohlíd musí uznat, že nástup sekvenování nové generace (NGS) umožnil studovat do té doby nestudovatelné (nebo jen s obtížemi studovatelné) a utratit částky do té doby nevídané. Chcete osekvenovat celý lidský genom? Zítra ho máte na stole (Teda v počítači na stole... Nebo v počítači v batohu, v tašce, klidně i na zemi. Vytisklý na papír by se vám tam nevešel, ani kdybyste si tam uklidili ten nepořádek, protože by byl přes 262 tis stránek dlouhý. To je jako 175 tlustých knih. Mohla bych v přirovnávání pokračovat, jak vysoký stoh by to byl a jak dlouho by musela letět moucha, aby dosáhla vrcholu, ale prostě geniality Cimrmana bych nikdy nemohla dosáhnout, a tak jen drobná reminiscence na jeho odpověď v prvním světovém internetu: Muchomůrka zelená je tak prudce jedovatá, že pouhý její úlomek byl by schopen otráviti takové množství myší, že tyto položeny vedle sebe vytvořily by řadu, podél níž by zdatný chodec pochodoval 34 dnů. A já chci cenu za vytvoření nejdelší a nejzbytečnější závorky tohoto roku). Mno a v tom počítači na stole můžete mít do zítřka i stovky lidských i jakýchkoliv jiných genomů, obdobně transkriptomů a dokonce i našich milovaných metagenomů. Ne že bychom do té doby nevěděli, že s námi cestují malí spolubydlící pomáhající nám s trávením potravy, produkcí vitamínů a i o té podpoře imunity jsme to tak nějak tušili. Ale že jich je takové množství druhů, že je mezi hostiteli tak dechberoucí variabilita a že souvisí s rozvojem tolika civilizačních onemocnění, to by si před nástupem NGS tipnul jen vědec se slovem Nostradamus ve jménu (u ženy je přípustná varianta Sibyla). Takže prostě NGS je minimálně technologickým milníkem. A protože seznámení se s technologií NGS je před samotnou přípravou knihovny nezbytné, jdeme si k němu čuchnout už teď.

Pro zjednodušení se nyní zaměřím pouze na dnes nejrozšířenější technologii Illumina, která využívá sekvenaci syntézou (tedy zahrnuje amplifikační krok pomocí PCR). Amplifikační krok se (jak už zkušený čtenář jistě předpokládá) může stát zdrojem chyb, a proto mnohé sekvenační metody novějších generací již PCR krok nevyžadují. Dnes je v zájmu zachování rozumné délky článku vynecháme, ale nemusíte se bát, jak jsem již v předchozích příspěvcích slibovala, v některém z dalších okének se podíváme i na to, jak osekvenovat celý gen pro 16S rRNA a v ten okamžik si představíme i platformy tzv. 3. generace umožňující sekvenaci dlouhých readů bez PCR kroku. Ale hezky postupně, nic neuspěchejme. Aby nám okénko nenabobtnalo do ještě extrémnějších rozměrů, omezíme se dnes i ve věci předmětu našeho zájmu, a budeme se věnovat pouze DNA. RNA i s jejím specifickým přepisem do cDNA, způsoby fragmentace či popisem metody, jak vybrat k sekvenaci pouze mRNA si taktéž schováme na jindy. Jojo, jen tak se mě nezbavíte😊.

Illumina má celé spektrum přístrojů, které vybíráte podle toho, jakou prosekvenovanost váš projekt potřebuje a podle počtu vzorků, které chcete průměrně sekvenovat (tedy pokud potřebujete sekvenovat malé diagnostické panely co druhý den, aby pacienti dlouho nečekali, stačí jeden z přístrojů s co nejmenším outputem, protože někdy méně znamená více). Přehled který přístroj je vhodný na kterou aplikaci najdete zde.

Obecný postup sekvenování je následující:

Obrázek č. 1 – Obecný postup sekvenace na přístrojích Illumina



1. V prvním kroku se zamilovaně podíváte na svoji čistou DNA, kde máte přesně to, čehož jednotlivé báze si přeje vaše oko spatřiti.

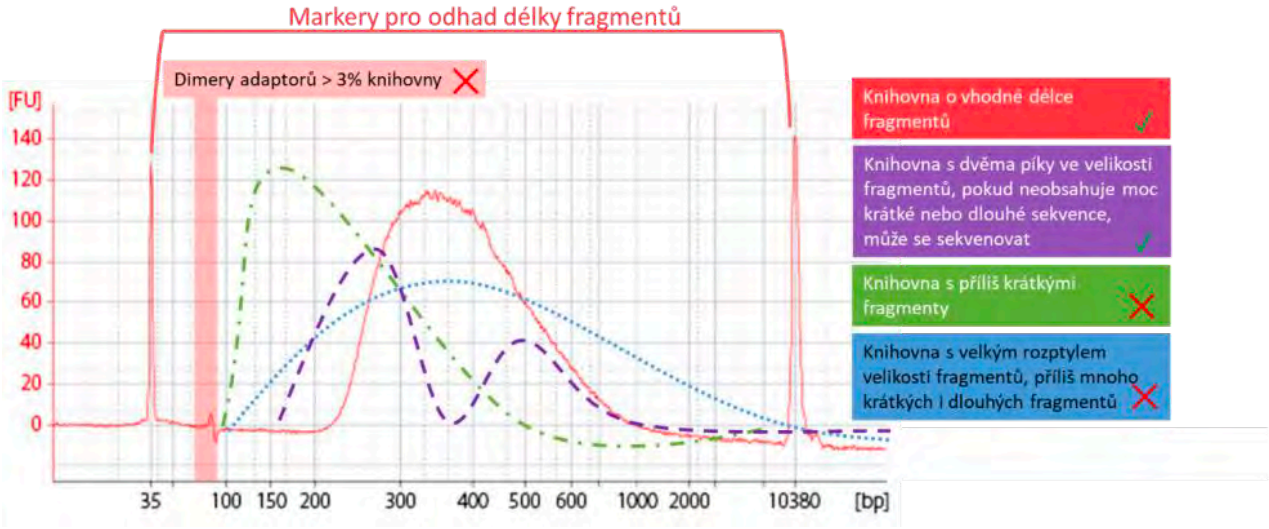
2. Protože sekvenátory druhé generace čtou pouze krátké ready (od 36 bp do 2x300 bp), je v případě genomové nebo celometagenomové DNA potřeba zvolit vhodnou fragmentaci. K fragmentaci můžete využít buď enzymatické štěpení, nebo mechanické, které je nejčastěji provedeno působením ultrazvuku. V dnešní době se více prosazuje enzymatické štěpení, protože je jednoduché, nevyžaduje žádné další přístrojové vybavení a neprodražuje se na rozdíl od sonikace ve spotřebním materiálu. Sonikace naproti tomu poskytuje více vyrovnané knihovny v požadované délce fragmentů. Výhody a nevýhody obou postupů jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Výhody a nevýhody mechanické (sonikace) a enzymatické fragmentace

	Výhody	Nevýhody
Sonikace (mechanická fragmentace)	Zvládne úspěšně nafragmentovat široké rozsah koncentrací vstupního materiálu	Vyžaduje speciální drahé vybavení a ke každé reakci speciální drahý spotřební materiál
	Nevnáší žádnou chybovost	Při sonikaci velkého množství vzorků je metoda časově velmi náročná
	Vytváří rovnoměrně dlouhé fragmenty	Vyžaduje větší množství vzorku a může způsobit ztráty
	Není potřeba ke vzorku přidávat další chemikálie, které s ním mohou interferovat	
Enzymatická fragmentace	Stačí základní laboratorní vybavení, jednoduchý postup a lze zpracovávat větší množství vzorků najednou.	Může vnést chybu, která se později projeví u sekvenace
	Stačí menší množství vzorku	Bývá citlivá k počátečnímu množství DNA a k obsahu GC párů, často vyžaduje optimalizaci
		Může způsobit variaci mezi jednotlivými vzorky

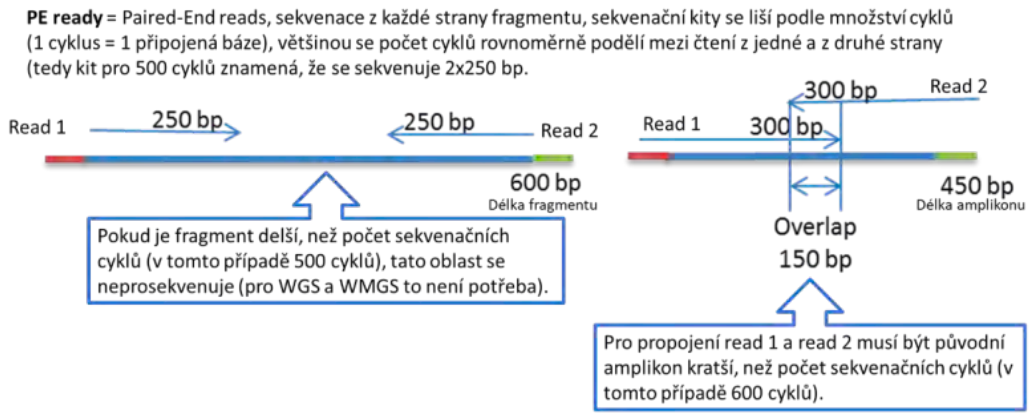
Pokud se ptáte, co je to ta požadovaná délka, tak odpověď není úplně jednoznačná. Záleží jak na zvoleném sekvenačním kitu (liší se délkou sekvenovaných oblastí), tak i na zvoleném kitu pro přípravu knihoven, proto se držte pokynů výrobců. Obecně by se délka měla v průměru pohybovat mezi 200-500 bp bez adaptérů. Dlouhé ready vykazují sníženou kvalitu zejména v readu 2 (za chvíli se dočtete, co to ten read 2 je). Krátké fragmenty se zase váží efektivněji a jsou pak nadměrně zastoupené. Navíc pokud jsou kratší než zvolená délka readu, prosekvenujete se až na flowcell, což může při velkém počtu takovýchto fragmentů vést až k předčasnému ukončení runu, nebo zhoršení jeho kvality. Pozor, oba extrémy můžete mít v rámci jedné knihovny! Vždy je potřeba si pomocí kapilární elektroforézy zkontrolovat, jak dlouhé fragmenty v knihovně jsou přítomny. Příklady sekvenovatelných i nesekvenovatelných knihoven si můžete prohlédnout na obrázku č. 2.

Obrázek č.2 – Příklady sekvenovatelných i nesekvenovatelných knihoven (resp. sekvenovatelných jen pro odvážné a bohaté)



Samozřejmě pokud nezačínáte genomovou DNA, ale PCR amplikony, tak fragmentaci dělat nemusíte, ale volíte PCR produkt o vhodné délce (tedy tak, aby se vám při čtení z obou konců propojil – pokud sekvenuji 2x250 bp, potřebuji ideálně 50 bp na překryv, takže amplikon může být max. 450 bp dlouhý, viz. obrázek č. 3).

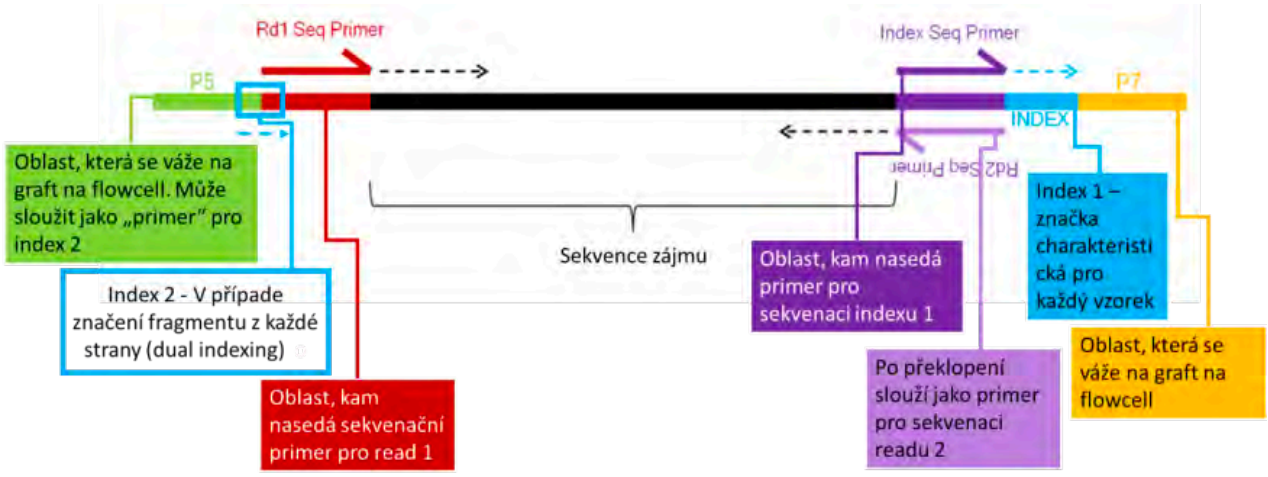
Obrázek č.3 – PE ready bez propojení (overlapu) pro celogenomové a celometagenomové knihovny a s overlapem zejména pro amplikonové knihovny (např. pro gen 16S rRNA)



3. Pokud chceme naše fragmenty osekvenovat, musíme k nim připojit adaptor (obrázek č. 4), který je naprosto nezbytný. Ptáte se proč?

- Protože zajistí navázání každého fragmentu na flowcell (destičku, na které v přístroji probíhá tvorba klastrů a sekvenace). K tomuto navázání slouží na straně adaptoru sekvence (zelená P5 a žlutá P7 oblast na obr. 4) komplementární k oligonukleotidům (graftům) pokrývajícím flowcell. Na flowcell jsou dva typy graftů, P5 (zelená oblast) a P7 (žlutá oblast) a tedy i naše fragmenty musí mít na každé straně jiný adaptor.
- Protože poskytuje místo pro navázání sekvenačních primerů pro read 1 a read 2 (červená a světle fialová oblast), protože bez primerů by nemohla proběhnout PCR potřebná pro samotnou sekvenaci.
- Protože zajistí rozlišení našich vzorků mezi sebou. Sekvenační kapacita je příliš velká, než abychom sekvenovali pouze jeden jediný vzorek a proto je v podstatě vždy multiplexujeme (= sekvenujeme více vzorků najednou, prostě je smícháme). Na adaptoru najdeme značku (index, tag, mid – modrá oblast), která umožní každý vzorek podepsat. Zatímco index 1 má vždy svůj primer (pro jeho nasednutí slouží tmavě fialová oblast) a tedy musí být pro něj i oblast na adaptoru, pro index 2 slouží u některých přístrojů jako „primer" graft z flowcelly, u jiných má svůj speciální primer a situace je tedy podobná jako u indexu 1

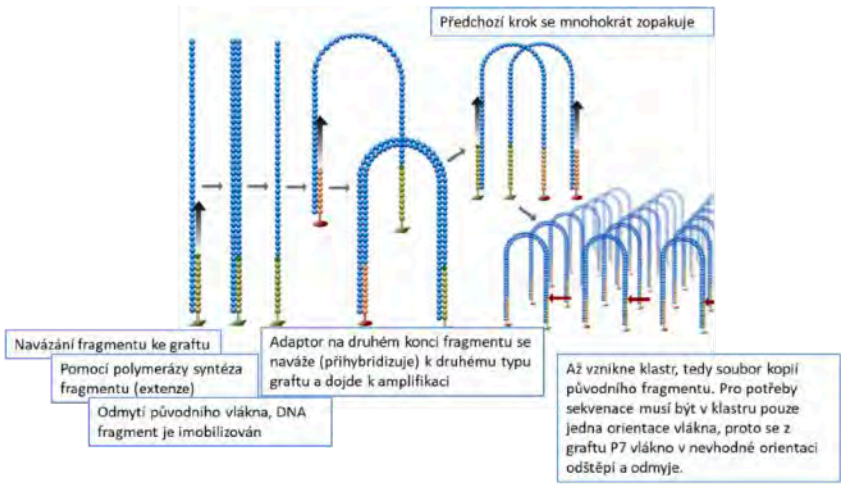
Obrázek č. 4 – Schéma adaptorů upraveno



4. Než se konečně dostanete k přístroji, čeká vás poslední úkol. Do přístroje totiž musí jít knihovna o správné koncentraci. Pokud dáte málo koncentrovanou knihovnu, získáte málo (ale kvalitních) dat. Pokud příliš vysokou, budou se překrývat klastry (viz. další body) a vy nezískáte jasný signál a dané sekvence nepůjdou přečíst. Získáte tedy velké množství nekvalitních dat. Po tomto úkolu se už ale opravdu přesouváme k sekvenačnímu přístroji a vkládáme do něj vzorek. Teď už je pouze v moci jeho fluidiky bezproblémové nanesení vzorku na flowcellu. Flowcell je takové sklíčko, na kterém jsou navázány grafty komplementární s našimi adaptory a které je opatřeno porty pro možnost promývat flowcell všemi pro sekvenaci potřebnými roztoky. Ještě se můžete u největšího z přístrojů, NovaSequ, setkat s tzv. paternovanou flowcell, která je opatřena jamkami a do každé jamky je možné navázat jen jeden fragment. To vede k přesnějšímu a rychlejšímu sekvenování, kde vám nedělá takový problém rozšířený nešvar špatně změřené koncentrace knihoven.

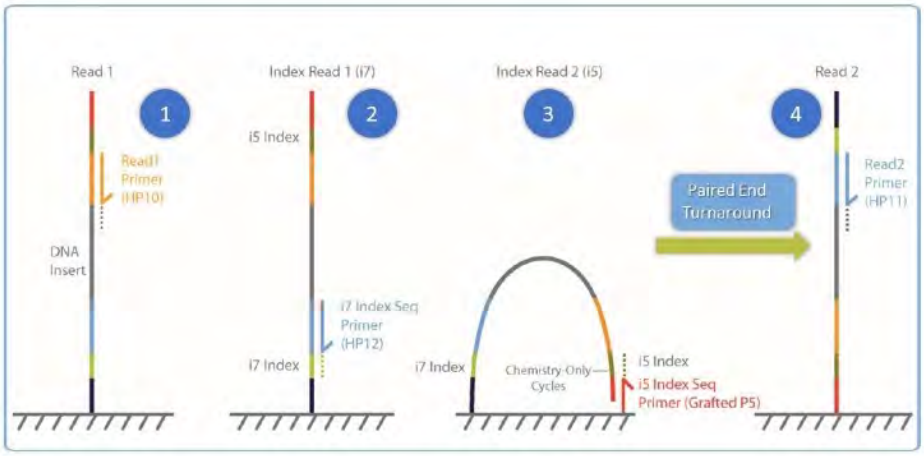
5. Ještě, než začneme sekvenovat, musíme si každý fragment DNA amplifikovat, abychom získali tzv. klastry (obrázek č. 5). Každý klastr by měl obsahovat pouze kopie jednoho fragmentu a klastry by měly mít kolem sebe dostatek prostoru, aby je kamera dokázala mezi sebou rozlišit. Díky zmnožení templátu zvýšíme intenzitu signálu, který pak není pro citlivý detektor problém zachytit. Celý proces nazýváme můstkovou amplifikací (bridge amplification).

Obrázek č. 5 – Schéma vzniku klastrů upraveno



6. Sekvenace není nic jiného, než PCR se značenými nukleotidy. V každém cyklu se připojí vždy jen jeden nukleotid, takže koupíte – li např., kit pro sekvenování 2x150 bp (300 cyklů), osekvenujete přesně 150 bp z jedné strany fragmentu a pak 150 bp z druhé strany fragmentu (obrázek č. 6). Pro dobrodruhy je možné si ale s nastavením hrát a zkusit osekvenovat např. 200 bp z jedné strany a 100 bp z druhé strany fragmentu. Často se ale s aplikacemi, které by něco takovéhoto vyžadovaly nesetkáte. V těchto 300 cyklech chemie nejsou započítány potřebné cykly pro indexy, ty vám poskytuje Illumina zcela zdarma.

Obrázek č. 6 – Schéma samotné sekvenace



Vždy se jako první čte read jedna, k čemuž slouží zmiňovaný sekvenační primer pro read 1. Následně se přečte pomocí vlastního primeru index 1. Po připojení k druhému graftu nám samotný graft poslouží jako primer pro index 2. Následuje syntéza druhého řetězce a původní řetězec odmyjeme (tím

jsme si překlopili sekvenci do opačné orientace), a můžeme osekvenovat read 2 pomocí primeru pro read 2. Proto tedy ve výsledcích vidíme všechny hodnocení kvality pro 4 ready, jejichž pořadí je read 1, index 1, index 2 a read 2. Výhoda samostatného čtení indexů je v tom, že se vždy přečtou s dostatečnou kvalitou, i když z nějakého důvodu klesá kvalita čtení vlastní sekvence.

7. A už jenom čekáme na vyhodnocení softwaru, který nám řekne řetězec všech bází za sebou. Jak že k nim vlastně přijde? Při fázi sekvenování jsou při amplifikaci do řetězce inkorporovány značené báze s reverzibilním terminátorem. Každá ze 4 bází má svou fluorescenční barvičku. Ve chvíli, kdy se inkorporuje, dojde k detekci barvičky. Protože má každý nukleotid kromě barvičky taky reverzibilní terminátor, nemůže se připojit více než jedna báze. Po detekci dojde k odblokování nukleotidu, odstranění fluroforu a cyklus může začít nanovo. Ze sérií záblesků pak software zrekonstruuje celou sekvenci našeho fragmentu a my se dostáváme na konec cesty😊.

Celý proces, který následuje po nanesení vzorku na flowcell můžete sledovat už klidně z druhé strany světa, online na BaseSpace. Tam také můžete nalézt kvalitativní parametry celého sekvenačního runu. Výsledky vám v počítači přistanou v tzv. FastaQ formátu a vy si s tou hromadou výsledků můžete vesele hrát, dokud nedostanete jednoznačný požadavek od vašeho šéfa vše sepsat do článku, který spasí svět, ideálně v kvalitě pro Nature.

Kdo dočetl až sem, zaslouží metál. Dneska možná mírně ubylo humoru a přitvrdilo se s množstvím pojmů, ale řekla jsem si, že když už, tak už, a přeci jen NGS vytlačuje z laboratoří starší metody a potká se s ním téměř každý pracující v oblasti molekulární biologie, tak proč mu nerozumět?

Výhody sekvenace jsou nasnadě. Přesto můžeme nalézt i mnoho nevýhod. Pro velké metagenomické projekty je metoda stále drahá, sekvenace stále vykazuje určitou chybovost a obzvláště v metagenomice bychom uvítali dlouhé ready, je to tedy jeden z důvodů, proč o střevním mikrobiomu stále h...o, pardon, STOLICI víme.

MikrobioKuchyně

Dubujang počesku – neznámá lahůdka korejské klášterní kuchyně

Ani nevím jak, ale nějak mě během jednoho večerního prokrastinování YouTube zavedl k videím korejského kulturního centra. Z nich mě zaujalo především jedno. Zenová korejská řádová sestra Jeong Kwan tam předvádí výrobu fermentované tofu pasty dubujang (čti: dubužank). Zarazil jsem se, protože jsem o tomto fermentovaném pokrmu ještě neslyšel, a to u nás doma kvasí nejedna sklenice se záhadným obsahem. Vyhledávání googlem mi rychle odhalilo, že v českém prostředí o dubujangu skutečně není napsáno ani ň. Ale ani na anglickém internetu toho moc není – pouze články a videa, kde Jeong Kwan popularizuje korejskou klášterní kuchyni nebo recenze na korejské restaurace, které vaří podle klášterních způsobů.

S průkopnickým pocitem prvenství jsem se tedy rozhodl pustit se do přípravy (snad) prvního českého dubujangu. Je to vlastně hrozně jednoduché. Člověk musí vymačkat z jednoho bloku tofu vodu, rozmačkat ho rukama na co nejjemnější kousky, přidat lžíci sójovky, větší lžíci soli a nechat takto vzniklou pastu řádně promíchanou a upěchovanou v uzavřené sklenici „pracovat“ týden na teplém

místě. Má to ale jeden háček – dubujang přesně podle receptu v Česku vlastně nejde udělat. Dno sklenice se totiž má vymazat trochou již hotového dubujangu, stejně tak jako se má nahoře ve sklenici z hotového dubujangu udělat „zátka," která zamezí přístupu vzduchu. Ani korejští buddhisté v mém

okolí dubujangem nedisponují, proto jsem se rozhodl improvizovat à la Jirka Babica. Když nemáš dubujang, dej tam miso. Zazátkoval jsem tedy sklenici několikamilimetrovou vrstvou miso pasty, neboli pasty z luštěnin, na kterých zhruba dva roky hodovala kulturní plíseň kropidlák rýžový. Pravděpodobně to trochu změnilo proces fermentace, který se ve sklenici odehrával, ale rozhodně ne k horšímu. Po týdnu na topení obsah sklenice trochu nakynul, nechytil žádnou plíseň (díky bohu) a chytil sytou béžovou barvu. Chuťově je výsledek výborný – výrazná je především slaná a bohatá umami chuť. Dokonce i vůně je libá, připomíná jemný sýr. Rozhodně nečekejte silná aromata čpavku a sirovodíku, která můžete znát z alkalických fermentací luštěnin. Jediné, co bych svému dubujangu vytkl, je konzistence. Je trochu moc hrudkovitý. Pravděpodoně je to tím, že jsem zvolil „klasické" pevné tofu, které člověk sežene v supermarketu. Doporučil bych tedy příště zkusit hedvábné tofu z asijského obchodu, konzistence pak asi bude krémovější, tak jak má být.

Ve chvíli, kdy mám dubujang hotový, se samozřejmě otevírá klasická nerudovská otázka - Kam s ním? V korejské klášterní kuchyni se dubujang podává jako součást pestrého, dvakrát denně konzumovaného, jídla, kde je tak nějak všechno. Na páře vařená zelenina, vývar, rýže, sója. Já se ale musím přiznat, že takhle fancy nejím, a že jsem si to prostě mazal na chleba s margarínem. I tak mohu vřele doporučit.

Aktualita:

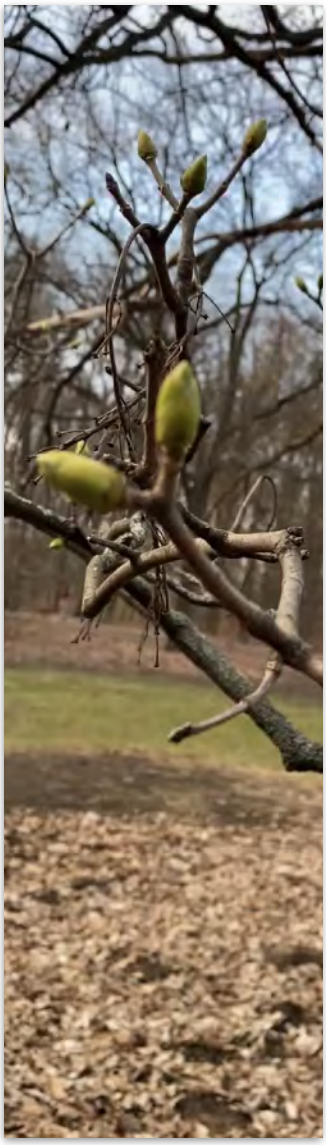
Souvislost střevního mikrobiomu s chronickým únavovým syndromem

Myalgická encefalomyelitida (ME), známá také jako chronický únavový syndrom (CFS), je onemocnění charakterizované mimo jiné dlouhodobým extrémním vyčerpáním, psychickým útlumem, bolestmi svalů a střevními problémy, kdy ke zlepšení nedochází ani po důkladném odpočinku. Spouštěče ME/CFS nejsou známy, a přestože pacienti mají změněnou střevní mikrobiotu, důsledky mikrobiálních změn spojených s ME/CFS zůstávají nejasné.

Podle recentní studie je ME/CFS je spojena se sníženou hladinou střevních mikrobů schopných produkovat butyrát - metabolit, který se podílí na zachování integrity střevní bariéry a modulaci imunitního systému. Výsledky jejich studie, které byly publikovány v časopise Cell Host & Microbe, mohou pomoci vyvinout nové diagnostické nástroje a lepší zvířecí modely ME/CFS.

Williamsova studie na vzorcích 106 osob s ME/CFS a 91 zdravých kontrol zjistila, že u lidí s ME/CFS byla snížena hladina *Faecalibacterium prausnitzii* a *Eubacterium rectale*, dvou mikrobů produkujících butyrát, které jsou běžné v lidském střevě. Tým zjistil, že nižší hladiny *F. prausnitzii* byly spojeny s těžší únavou. Podle vědců mohou tyto výsledky poskytnout cíle pro diagnostické nástroje a terapeutické přístupy. „I když tato zjištění jednoznačně neprokazují příčinné vztahy mezi poruchami mikrobiomu a symptomy, představují tyto vztahy mezi mikrobiomem a symptomy potenciálně využitelné, manipulovatelné cíle pro budoucí terapeutické studie," říká Williams. "Tyto studie by se mohly zaměřit na dietní, probiotické, prebiotické nebo synbiotické intervence a mohly by poskytnout přímý důkaz, že střevní bakterie ovlivňují projevy chronických symptomů."

Čas ukáže, zda by tato zjištění mohla přispět k vývoji nových diagnostických nástrojů a lepších zvířecích modelů ME/CFS.



Toto číslo pro vás připravila redakční rada.

Hlavní téma zpracovala:
RNDr. Andrea Palyzová, Ph.D.

Dubujang připravil, vykvasil, statečně ochutnal, přežil a Kuchyňské okénko napsal a opatřil fotografiemi Bc.Jakub Caha.

Redakční rada Mikrobio(m)novin:

MUDr. Jiří Vejmelka
Doc.RNDr. Monika Cahová, Ph.D.
Mgr. Lucie Najmanová, Ph.D.
MUDr. Jakub Hurych
Mgr. Petra Vídeňská, Ph.D.

Grafické zpracování :

Mgr. Michaela Bartoňová
www.michaelabartonova.cz

Těšíme se na vaše reakce, podněty a zajímavé příspěvky, které můžete zasílat na adresu:

cms@mikrobiom-cms.cz