

MIKROBIOMNOVINY

Informační servis

České mikrobiomové společnosti ČLS JEP, z.s.

Motto měsíce:

Buď jako bakterie,
spolupracuj!

Upozornění na akce:

Městská knihovna, Praha:

ČMS ve spolupráci
s Městskou knihovnou
v Praze vás srdečně zvou na
další přednášky z cyklu
Známe své spolubydlící?

Místo konání: malý sál
Ústřední městské knihovny
Mariánské náměstí, Praha 1
Čas konání: 19:00

24.4. 2024

RNDr. Eva Budínská, Ph.D.,
Recetox, Mikrobiom a solidní
nádory [ZDE](#)



29. 5. 2024

Mgr. Petra Vídeňská, Ph.D.,
Mendelova univerzita v Brně,
Mikroorganismy kolem nás
aneb komprimované
povídání o tom, proč
bychom si to s nimi neměli
rozházet. [ZDE](#)



Editorial

Milé čtenářky, milí čtenáři,

EVOLUCI nelze zastavit, a tak i naše redakční rada (RR) po třech letech své činnosti pochopila výhody dělby práce. Proto jsou nově některé rubriky nastálo přiděleny jednotlivým členkám a členům naší rozšířené RR. Hanka s Eliškou například vyfasovaly Mikrobiom(m)novinky, ve kterých se můžete tentokrát těšit na „Mikrobiom městských ekosystémů“ a „Rozvoj viromu u dětí“. Ale žádný strach, kvalitu samozřejmě neměníme, takže Petře metodické okénko zůstává (a jen tak mimochodem, začátkem února připravila Petra skvělou dvojpřednášku o sekvenačních metodách a analýze mikrobiomu, kterou jsme pro další generace uchovali na našem YT kanálu <https://www.youtube.com/channel/UCmLnoyGDaYkuDYj9SPcyHw>).

Co je ale NOVINKA ze všech největší??? Bouchněte šampaňské, setřete slzu z oka, svět literatury už nás nemůže ignorovat - MÁME ISSN! V souvislosti s tím se musíme začít chovat jako opravdové novinářky a novináři, takže už žádné články bez podpisu a každá stránka pěkně očíslovaná! Ať můžete citovat :D.

Tak. Pěkně jsme se pochválili a teď si pojďme přiznat, že svět se netočí jen kolem nás lidí! Bakterií je na planetě mnohem, mnohem víc, jsou tu mnohem déle, a my při vši snaze jen pomalinku a nepatrně poodhalujeme jejich neuvěřitelně komplexní a zpracovaný svět.

Konference:**16. 4. 2024 od 9:00**

Symposium Společnosti pro probiotika a prebiotika, Praha [ZDE](#)

**27.-30. 4. 2024 Barcelona**

European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) [ZDE](#)

**26.-29. 6. 2024 Kodaň**

EuroBioFilms 2024. [ZDE](#)



Jak málo toho stále víme a co všechno bychom se od bakterií mohli naučit, si tentokrát ukážeme na příkladu biofilmů. Asi logicky se nám hlavní téma trochu zvrtilo směrem k tomu, jaké nám biofilmy dělají potíže v medicíně a jak proti nim bojovat. Ale abychom nebyli nespravedliví, příště Vám ukážeme, co skvělého mohou biofilmy pro lidstvo vykonat (je toho tolik a je to tak moc zajímavé, že to vydá na vlastní číslo).

Za celou redakční radu Vám přejeme, aby se Vám náš dospělejší a uspořádanější zpravodaj líbil a přinesl Vám tu správnou kombinaci poučení, radosti a úžasu nad vynalézavostí Matky přírody.

Lucie Najmanová

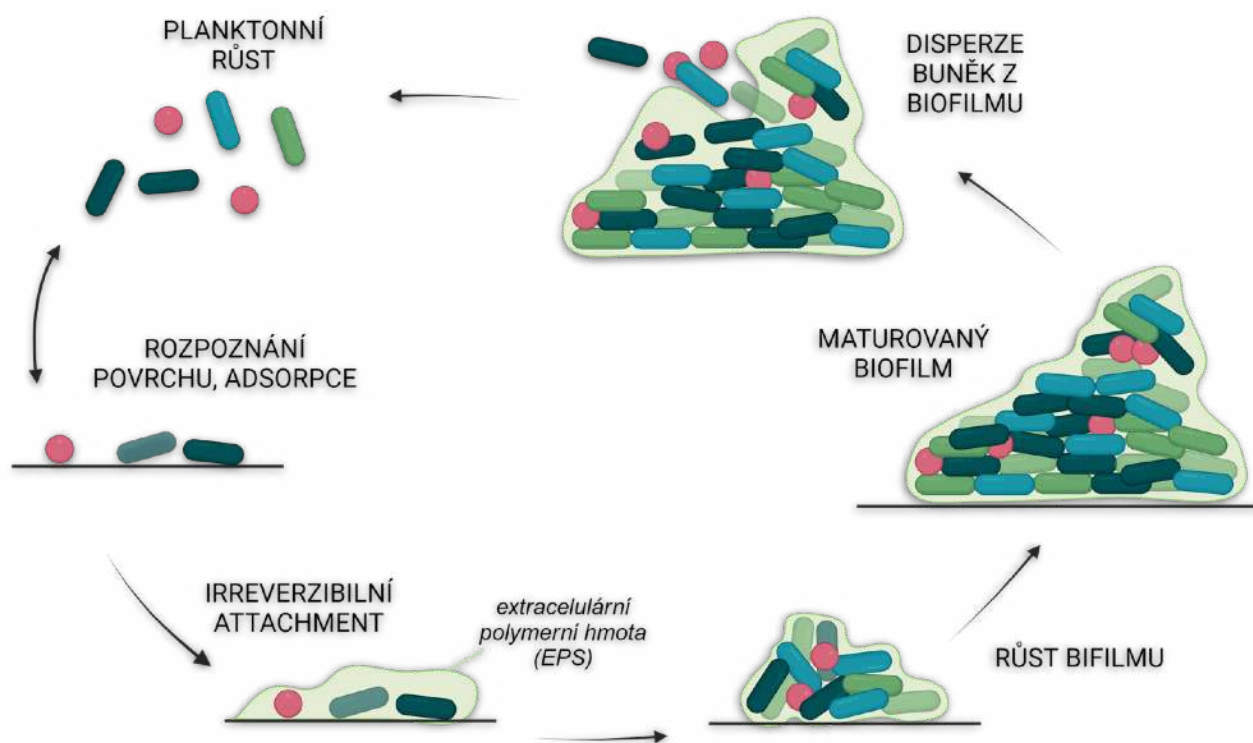
Téma měsíce:

Záhada zvaná Biofilm

Jedna z teorií vysvětlujících, proč lidé (v podstatě nešikovní, neobratní, a primárně bezbranní) v evoluci dokázali převálcovat všechny ostatní druhy, viní z našeho úspěchu schopnost domluvit se a spolupracovat. Děti to učíme od malička, třeba na příkladu jistého Svatopluka, jeho tří synů a několika větví. Ale tváří v tvář bakteriím si musíme přiznat, že v tomto ohledu jsme rozhodně neobjevili Ameriku jako první. Na rozdíl od nás navíc bakterie rozhodně nejsou xenofobní! Vzájemně výhodné interakce navazují nejen s příslušníky svého vlastního společenstva, ale i mezi poměrně vzdálenými taxony včetně zástupců odlišných říší. Tvoří tak vzájemně spolupracující společenství, které nazýváme biofilm. Výjimkou nejsou smíšené biofilmy bakterií, kvasinek i archaea [1]. S jistou mírou nadsázky lze biofilm přirovnat k tak komplexnímu společenství, jakým je například les. Biofilm je asi nejstarší a nejčastější formou života na zemi. V biofilmech žije až 80 % bakterií. Někteří autoři spekulují, že volně (planktonně) rostoucí buňky prostě jen zatím nenašly vhodný substrát, na který by se přichytily a začaly tvořit biofilm.

Biofilm bývá obvykle definován jako organizovaná komunita mikroorganismů osidlujících nějaké pevné povrchy. Takovým pevným povrchem může být kámen v řece, náš zub, vrstva mucinu ve střevě nebo třeba jen pevná částice, která se do střeva dostala s potravou a volně se pohybuje. Společným rysem biofilmů je vazba buněk na extracelulární matrix, často označovaná anglickou zkratkou EPS (extracellular polymeric substance). EPS tvoří strukturovaný sdílený prostor, jehož vlastnosti se odvíjí od druhového složení biofilmu a prostředí, ve kterém se biofilm tvoří, a zpětně ovlivňují vlastnosti i funkce biofilmu. EPS může být tvořena polysacharidy, proteiny, extracelulární DNA (eDNA), lipidy, celulózou, nejrůznějšími amyloidními vlákny a minerálními látkami. EPS buňkám zajišťuje životní prostředí s dobře vyřešeným transportem vody a živin. V biofilmu jsou buňky mnohem lépe chráněny před nepříznivými podmínkami prostředí včetně osmotického stresu, extrémních teplot a pH, nebo před působením antibiotik či imunitního systému hostitele.

U buňky jednoho druhu můžeme odlišit tři fenotypově odlišné stavy: buňku rostoucí volně (planktonně), buňku rostoucí v biofilmu a buňku uvolněnou z biofilmu na konci jeho životního cyklu (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1 Životní cyklus buněk v biofilmu

Tato tři fyziologická stadia se mohou velmi lišit svým metabolismem i citlivostí k vnějším podnětům, jako jsou například antibiotika nebo složky imunitního systému. V porovnání s planktonně rostoucími buňkami mohou stejné buňky v biofilmu bez problémů snášet řádově vyšší koncentrace antibiotik [2]. Mechanismů, které přispívají ke zvýšené odolnosti biofilmu, je celá řada, a výsledný efekt je vždy kombinací mnoha z nich:

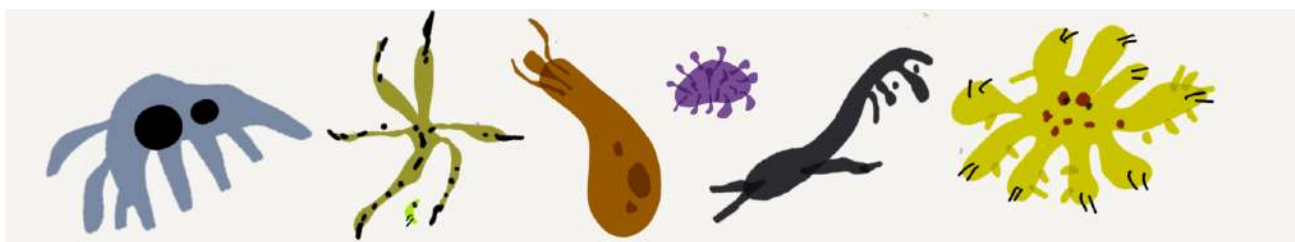
a) EPS ovlivňuje volnou difúzi látek z prostředí.

Bývá tvořena pozitivně nabitými molekulami (proteiny, glykoproteiny, glykolipidy), které efektivně váží záporně nabitě látky, a ty se tak k cílovým buňkám vůbec nedostanou. Typickým příkladem jsou aminoglykosidy, jejichž aktivní vychytávání v EPS dramaticky zvyšuje rezistenci biofilmu vůči těmto antibiotikům. Kromě toho se může uplatnit vliv hustoty prostředí – EPS může zabránit pronikání některých molekul čistě z důvodů jejich velikosti. Jiné látky ovšem mohou procházet volně, např. fluorochinolony difundují experimentálním biofilmem *Pseudomonas aeruginosa* bez omezení.

b) Zpomalení prostupu potenciálně toxických látek biofilmem dává níže uloženým buňkám čas k adaptaci. Kromě toho vzniká koncentrační gradient dané látky; buňky na okraji biofilmu mohou být ohroženy, ale buňky uvnitř jsou vystaveny až řádově nižším koncentracím, které mohou mít zcela odlišný fyziologický účinek (viz dále).

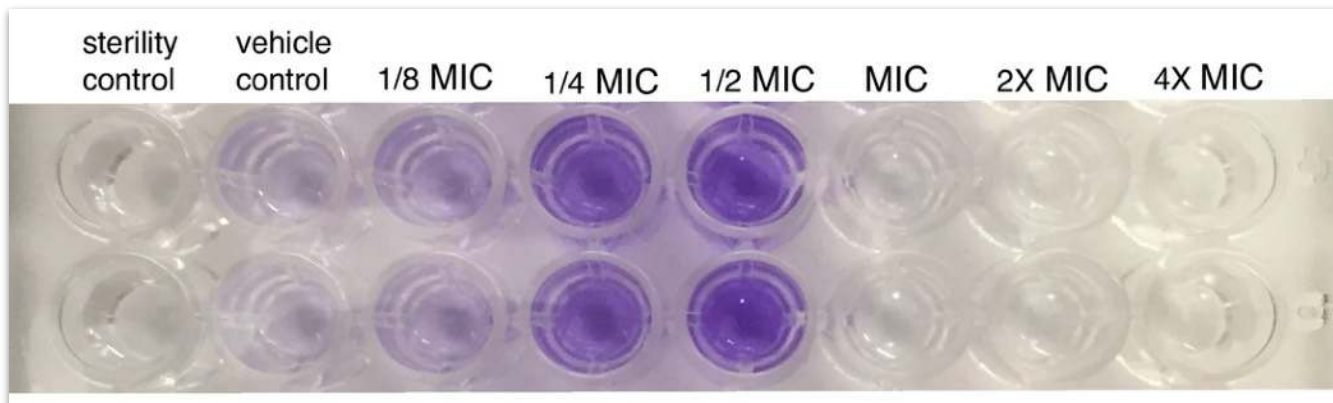
c) Adaptace může vycházet i z vyšší míry mutagenese v biofilmu v porovnání s planktonním růstem (v biofilmech byla prokázána vysoká koncentrace ROS - reactive oxygen species, které mohou způsobovat změny v DNA). Fyzická blízkost buněk a vysoká koncentrace DNA (eDNA) také přispívají k řádově vyšší míře výměny genetického materiálu mezi buňkami (horizontální genový transfer, častý mechanismus předávání genů rezistence k antimikrobiálním látkám).

- d)** Adaptací může být také **přechod** buněk v nejstarších vrstvách zralého biofilmu **do perzistentního nebo dormantního stavu**. Pro biofilm bývá typický gradient živin a saturace kyslíkem a s tím související druhová variabilita a rozdílná metabolická aktivita buněk v různých vrstvách biofilmu. V důsledku horší dostupnosti živin pak mohou buňky spodních vrstev biofilmu postupně utlumovat svou metabolickou aktivitu a přecházet do některého z výše uvedených klidových stavů. Vzhledem k tomu, že většina antibiotik cílí na buněčné mechanismy spojené s růstem a metabolickou aktivitou, představuje tento útlum aktivity další z mechanismů, jakým bakterie v biofilmu mohou např. překonat antibiotickou terapii.
- e)** V EPS se mohou **kumulovat exoenzymy**, které mohou antibiotika inaktivovat (typicky např. beta-laktamázy). Starší maturované biofilmy *P. aeruginosa* tak mohou vykazovat vyšší míru rezistence než mladý biofilm stejného organismu. U smíšených biofilmů samozřejmě extracelulární hydrolýza antibiotik chrání i ty členy společenstva, které sami potřebné enzymy produkovat nemohou.
- f)** EPS může obsahovat značné množství **eDNA**. Záporně nabitá DNA může chelátovat hořčičnaté ionty, čímž snižuje jejich efektivní koncentraci v prostředí. U testovaných druhů *P. aeruginosa* a *S. enterica* to vedlo k aktivaci PhoPQ-PmrAB systému, který zajišťuje buňkám rezistenci k ATB poslední volby, polymyxinům. Obdobný aktivační efekt může mít i lokální snížení pH v důsledku akumulace eDNA.
- g)** Překvapivě tvorbu biofilmu ovlivňuje i další rezistenční mechanismus, který je typický především pro mikroorganismy produkující antibiotika, **efluxní pumpy** (membránové proteiny zajišťující aktivní export antibiotik z buňky ven). Přesný mechanismus není známý, ale na modelu *E. coli* bylo prokázáno, že mutace v různých genech pro effluxní pumpy významně redukovala schopnost buněk tvořit biofilm. Na mnoha případech byla dokumentována několikanásobně vyšší exprese genů pro effluxní pumpy u buněk rostoucích v biofilmu ve srovnání s planktonně rostoucími jedinci stejného druhu.
- h)** V dnešním moderním světě už i malé děti vědí, že skutečnou moc představují informace. Bakterie se dorozumívají pomocí vysílání a přijímání chemických signálů, tzv. **quorum sensing (QS)**. Na základě vyhodnocení chemických signálů mohou buňky zjistit, jak velká a denzní je jejich populace i jak je rozmanitá, jestli je stále dost živin nebo jestli nehrozí nějaké nebezpečí, a mohou adekvátně uzpůsobit svůj metabolismus. Zablokování QS může v biofilmu způsobit podobnou katastrofu, jako když doma dětem vypnete WIFI. Látky blokuující QS snižují schopnost tvořit biofilm a snižuje odolnost biofilmu vůči vnějším vlivům.



To vše ovšem staví vědce před pořádný problém - většina bakterií v těle roste v biofilmu, ale když v laboratoři testujeme antibiotické účinky nových látek, stále to děláme nejčastěji metodou stanovení MIC (minimální inhibiční koncentrace) s planktonně rostoucí monokulturou. To je přitom ta nejméně pravděpodobná forma, v jaké bychom patogen v těle potkali. Planktonní infekce jsou většinou dobře léčitelné antibiotiky a zcela vyléčitelné. Naproti tomu infekce způsobené biofilmy je velmi obtížné eradikovat, a často se to nepodaří. Pak nemoc přechází do chronického stavu (typicky např. cystická

fibróza, nebo parodontitida). Volbu vhodné léčby značně komplikuje i fakt, že některé antibakteriální látky mohou v subterapeutické koncentraci růst biofilmu dokonce podpořit (Obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 Ukázka, jak různé koncentrace antibiotika mohou zamezovat růstu biofilmu, ale i ho podporovat (Převzato z Ranieri et al., 2018 [3]) MIC = minimální inhibiční koncentrace; antibiotikum v množství dosahujícím nebo převyšujícím MIC růst buněk blokuje, v porovnání s kontrolou bez ATB (vehicle control) však koncentrace 1/2 a 1/4 MIC růst biofilmu naopak stimulovala.

Tento jev byl popsán jak pro dezinfekční činidla, používaná například na operačních sálech, tak pro antibiotika. Kastilské mýdlo používané chirurgy pro mytí rukou před operací svou funkci skvěle plnilo v koncentrované formě i při mírném ředění. Pokud byl ale používán pouze 30–40% roztok kastilského mýdla, byl růst biofilmu naopak stimulován! Analogicky působily i velmi nízké koncentrace řady běžně používaných antibiotik, a dokonce i mnoho aktivních složek humánních léčiv neantibiotické povahy [4]. Podrobně je tato problematika popsána ve webináři Lori L. Burrows [5], jejíž tým se této problematice dlouhodobě věnuje.

Jak tedy s biofilmy bojovat?

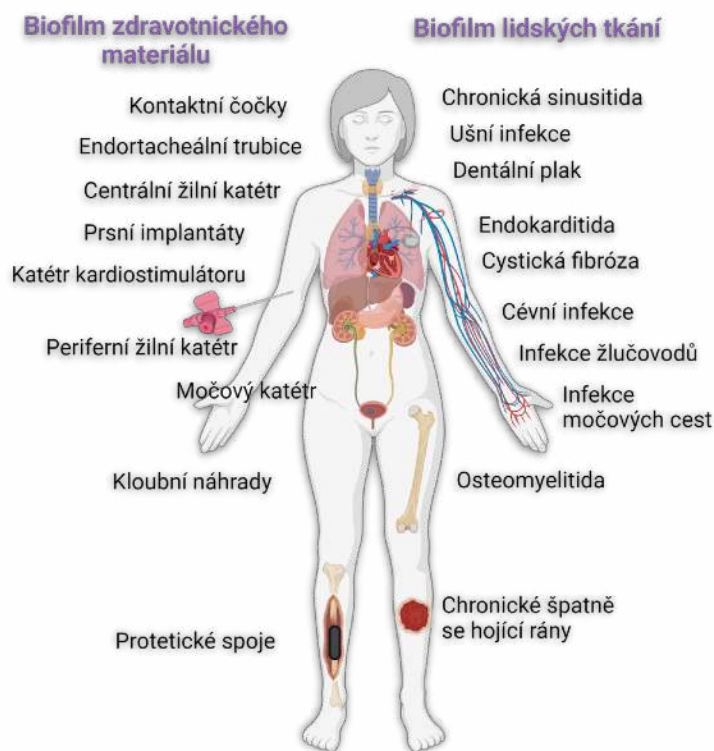
Klíčem je PREVENCE. Ve snaze zabránit buňkám biofilm vytvořit můžeme používat nejrůznější přístupy a jejich kombinace.

Z fyzikálních metod se často používá k ošetření povrchů slabé elektrické pole, které usazení prvních kolonizátorů brání. Tato metoda je účinná zejména v potravinářském průmyslu (například k ošetření trubek pro transport mléka). Účinným pomocníkem může být ultrazvuk (známe dobře například z dentální hygieny). Jisté úspěchy byly zaznamenány i s různě strukturovanými nebo naopak absolutně vyhlazenými povrchy, které buď principem „vyjetých kolejí“ brání šíření biofilmu mimo vyhrazený prostor nebo jsou naopak tak „klouzavé“, že neumožní uchycení bakterií.

Chemické metody zahrnují nejčastěji nějakou formu úpravy povrchů látkami, které nějakým způsobem s růstem bakterií interferují, nicméně jak bylo uvedeno výše, antibiotika (a dokonce i některé dezinfekční látky) mohou být dvojsečnou zbraní. Dobrých výsledků je ale dosahováno například ošetřením povrchu 4% roztokem EDTA (chelatační činidlo, které z prostředí odstraňuje ionty důležité pro funkci celé řady enzymů, čímž velmi efektivně blokuje metabolismus).

Poslední skupinou jsou metody biologické. Jisté úspěchy byly zaznamenány s použitím probiotik (v boji o životní prostor mohou zabrat místo problematictějšími „nájemníkům“). Příkladem může být využití laktobacilů v boji proti kazotvorným streptokokům v zubním plaku. Laktobacily mohou dokonce produkovat látky (bakteriociny), které jsou pro orální streptokoky baktericidní. Bohužel i laktobacily mohou působit zubní kazy, takže výsledný efekt není tak růžový, jak by se mohlo zdát. V poslední době jsou v souvislosti s antibakteriální terapií skloňovány bakteriofágy. Efektivnímu využití stojí v cestě fakt, že bakteriofágy jsou často vysoce specifické, zatímco biofilmy bývají polymikrobiální. Asi největší naděje můžeme upínat k využití nejrůznějších enzymů, a to buď samostatně nebo v kombinaci s antibiotiky. Jak bylo uvedeno výše, biofilm nemůže dobře fungovat bez efektivní komunikace (Co nám to jen připomíná?). Látky blokující QS vykazují v boji proti biofilmu velmi dobré výsledky [6]. Testují se také enzymy schopné štěpit složky EPS. Antibiotika mají v kombinaci s metodami narušujícími integritu biofilmu (enzymy i mechanická disrupce) výrazně větší šance.

Ačkoli to tak vůbec nebylo zamýšleno, vychází z našeho pojednání biofilm jako pěkný padouch, který na nás číhá za každým rohem, a se kterým je třeba bojovat všemi zbraněmi. V zájmu spravedlnosti ale musíme přiznat, že těch pár nepříjemných infekcí, za kterými biofilmy stojí (přibližně všechny myslitelné infekce všech lidských tkání a infekce veškerého představitelného zdravotnického materiálu; Obrázek č. 3) představuje jen malou část neuvěřitelné biodiverzity této formy života.



Obrázek č. 3 Biofilmy lidských tkání a zdravotnického materiálu

Biofilmy mohou konat i mnoho dobrého. Příznivci kuchyňského okénka jistě vzpomenou svou oblíbenou formu biofilmu, keřírová zrna, která z pohledu schopnosti formovat biofilm popsali Han et al., 2018 [7]. Prospěšných (z antropocentrického pohledu) forem biofilmu je ovšem tolik, že si to necháme na další číslo Mikrobi(m)novin.

T A K E - H O M E M E S S A G E

Dominantní životní formou bakterií je organizovaná komunita nazývaná biofilm; bakterie rostoucí v biofilmu mají jiný fenotyp než tytéž bakterie rostoucí volně.

Společným rysem biofilmů je vazba buněk na extracelulární matrix různého původu.

V biofilmu jsou bakterie chráněny před nepříznivými podmínkami prostředí včetně osmotického stresu, extrémních teplot a pH nebo před působením antibiotik či imunitního systému hostitele.

Většinu antibakteriálních léčiv testujeme in vitro na planktonních formách, přičemž v reálné situaci (infekce) je mnohem pravděpodobnější výskyt v biofilmu. Léčba biofilmu je ovšem velmi náročná, a často není možné ho eradikovat zcela.

Některá ATB, a dokonce i některé léky neantibiotické povahy, mohou v subterapeutických dávkách růst biofilmu stimulovat.

Lucie Najmanová

Literatura: [1] Sadiq, Faizan Ahmed, et al. "Trans-kingdom interactions in mixed biofilm communities." *FEMS Microbiology Reviews* 46.5 (2022): fuac024.

[2] Hall, Clayton W., and Thien-Fah Mah. "Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria." *FEMS microbiology reviews* 41.3 (2017): 276-301.

[3] Ranieri, Michael RM, Cynthia B. Whitchurch, and Lori L. Burrows. "Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials." *Current opinion in microbiology* 45 (2018): 164-169.

[4] Maier, Lisa, et al. "Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria." *Nature* 555.7698 (2018): 623-628.

[5] <https://www.youtube.com/watch?v=Q8JDp8KklkU>

[6] Dincer, Sadik, Fatima Masume Uslu, and Anil Delik. "Antibiotic resistance in biofilm." *Bacterial biofilms*. IntechOpen, 2020.

[7] Han, Xue, et al. "Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation." *Antonie Van Leeuwenhoek* 111 (2018): 2361-2370.



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

Všichni známe pořekadlo, že nic není staršího než včerejší noviny. A s lítostí vám všem musím oznámit, že se to týká i mého okénka. Asi pět okének zpět jsem tu dopodrobna popisovala technologii Illumina, jako nejpoužívanější, nejčastější atd. Vlastně potud je to stále tak. Ta technologie se nezměnila, stále ji naleznete téměř na všech stolech v sekvenačních laboratořích (vyjma Číny a dalších speciálních případů) a stále se na ní sekvenuje nejvíc. Přesto se v posledních měsících situace dramaticky změnila. Pokud v dnešní době chcete zakoupit sekvenátor na krátká čtení, menu je mnohem bohatší, a své chuťové pohárky tak můžete potěšit delikatesami nepoznanými, leč stejně chutnými. Dnes si tedy představíme nejnovější přístroje a nové technologie, nicméně to vezmeme hezky od podlahy. Rozhodla jsem se vám představit všechny sekvenační platformy, které prošly naším trhem, dnes na krátká čtení. Příští okénko se podíváme na zoubek sekvenátorům na dlouhá čtení.

U všech platform pro krátká čtení po fragmentaci a přidání adaptorů (přípravě knihovny) dochází k amplifikaci fragmentu. Tím se zmnoží templát tak, aby při sekvenaci bylo možné identifikovat jednotlivé báze. Přístroje se tedy liší v tom, jakým způsobem amplifikují fragmenty, použitou technologií začleňování jednotlivých nukleotidů a způsobem, jak probíhá detekce (viz Tabulka č. 1).

Platforma	SOLID	454	Ion Torrent	Illumina	MGI	AVITI	ONSO
Amplifikace fragmentu	EM PCR	EM PCR	EM PCR	Můstková amplifikace	RCA	RCA	RCA
Technologie	SBL	SBS	SBS	SBS	SBS	SBB (ABC-avidity base chemistry)	SBB
Detekce	Fluorescenčně značení dvojité báze	chemiluminiscenční – pyrosekvenování	Detekce uvolněných protonů – změna pH	Fluorescenčně značený nukleotid	Fluorescenčně značený nukleotid	Avidity (fluorescenčně značený polymer)	Fluorescenčně značený nukleotid

Tabulka č. 1 Všechny sekvenační platformy (nebo aspoň jejich většina) pro krátká čtení, které byly nebo jsou dostupné v Česku EMP PCR – emulzní PCR, RCA – rolling circle amplification, amplifikace otáčivou kružnicí, SBL – Sequencing by ligation, SBS – Sequencing by synthesis, SBB – Sequencing by binding

SBL – sequencing by ligation

Tuto technologii využíval pouze SOLiD. Je to tak složitá technologie, že jí v dnešní době nikdo nemusí rozumět. Proto si její vysvětlování tady odpustím. Kdyby ale někdo trpěl jistou formou masochismu a chtěl si ji nastudovat, má šanci zde [\[1\]](#).

SBS – sequencing by synthesis

Sekvenování syntézou je metoda sekvenování DNA, při které se k replikaci (syntéze) řetězce, který má být sekvenován, používají DNA polymerázy a dNTP. Můžeme rozlišit dva typy

a. Báze se přidávají postupně (prvně A, pak T, ...) a inkorporují se bez žádného blokování – tedy je-li na řetězci 5xA, inkorporuje se 5xT a detekuje se zvýšený signál – velká chybovost, nebývalo jasné, zda se inkorporovalo 5 nebo 8 stejných nukleotidů, již se nepoužívá. Výsledkem byly různě dlouhé sekvence. Tuto technologii využívalo 454 a IonTorrent.

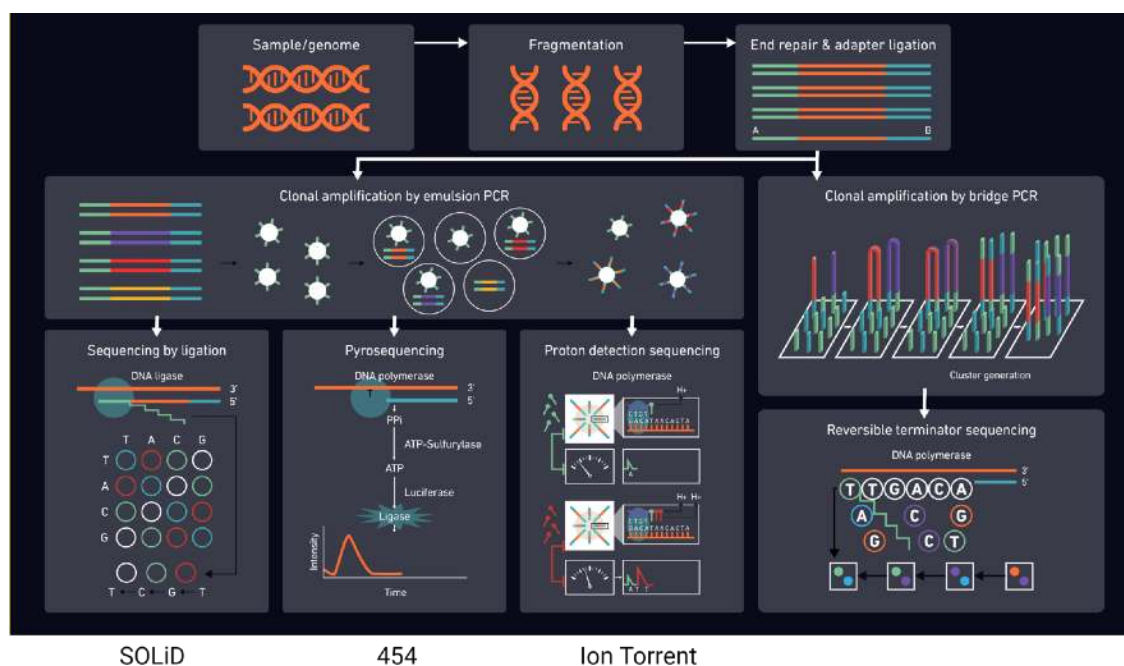
b. Všechny báze se přidají najednou, každá báze má svoji barevnou značku a je blokována. Inkorporuje se vždy jen jedna báze, po přečtení značky se odstraní fluorofor a blok, a může dojít k dalšímu cyklu. Vzniklé sekvence jsou stejně dlouhé (i když při trimmingu se nekvalitní báze zejména u konce odstraňují a v důsledku toho stejně dlouhé sekvence nemáme). Výsledkem je větší přesnost, zejména homopolymerech. Tuto technologii využívá Illumina a MGI.

SBB – sequencing by binding

Tuto technologii využívá AVITI, ONSO, ale jsou mezi nimi velké rozdíly. Značené nukleotidy jsou navázány, ale ne začleněny do rostoucího řetězce DNA, řetězec je prodlužován neznačenými nukleotidy. V podstatě se tedy jedná o dvoukrokový proces. To má tu výhodu, že se eliminuje tzv. molecular scarring, což je možné zhoršení kvality v důsledku SBS technologie, kdy mohou po odstranění fluoroforu zůstat tzv. linker arms. Po určitém množství cyklů mohou tato molekulární rezidua kumulativně interferovat s polymerázou, a tím snižují přesnost sekvenování.

Prvně začneme trochu nostalgicky a zavzpomínáme na sekvenační platformy, které již nejsou mezi námi. Patří sem SOLiD, 454 a Ion Torrent (Obrázek č. 1). Všechny pro pomnožení fragmentů využívaly emulzní PCR, u které byla snaha na kuličku navázat pouze jednu molekulu DNA, a tu zmnožit. Její obdoba se v dnešní době používá třeba u digitální PCR. Zatímco SOLiD se evolučně neosvědčil, prakticky téměř vůbec, další dva přístroje se i v našem malém rybníčku na pár let ohřály. Detekce se sice lišila (u 454 kaskáda enzymatických reakcí končící zábleskem o intenzitě odpovídající množství inkorporovaných bází vs u Ion Torrentu detekce uvolněných protonů měřených změnou pH; opět, čím větší změna, tím více inkorporovaných nukleotidů), ale obě technologie trpěly nepřesností v homopolymerech, a nebylo tedy jisté, zda je v sekvenci např. 6 adenosinů za sebou, nebo 8. A to už vám trochu naruší čtecí rámeček nejnemom tohoto okénka.

S nostalgii a se zvlhlým okem musím konstatovat, že ač nyní kolem mě běhají dvě malé esence štěstí (popravdě jsou to dvě VELKÉ instantní katastrofy, ale to se prý o vlastních dětech neříká, takže pšššt), moje první dítě byl 454 Junior. Kolik lásky a péče jsem mu během doktorátu věnovala, tolik mi oplácel krásnými a hodnotnými sekvencemi. A pak přišla na trh Illumina. Poskytovala větší množství sekvencí za výrazně nižší cenu. Celé trápení klonální amplifikace, kterou jste u 454 (i Ion Torrentu) strávili minimálně dva dny v laboratoři se strachem v srdci, zda máte dostatek správně obohacených kuliček, se najednou dělala sama v přístroji během pár hodin. A na mnoho let byla tato technologie, již jsme si již v dřívějším okénku podrobně vysvětlili, téměř monopolní sekvenační technologií. Ale nic netrvá věčně, a od minulého roku se vyskytuje konkurence i v našich končinách.



Obrázek č. 1 – Vyhynulé platformy (převzato z [2])

Do našich luhů a hájů jsme přivítali hned tři nováčky, a to MGI, AVITI a ONSO. V podstatě všechny nové přístroje mají jednu věc společnou, a to je klonální amplifikace, které se říká RCA, anglicky rolling circle amplification a česky amplifikace otáčivou kružnicí. Popularitu této technologii zajišťují jisté výhody, které žádná z předchozích neměla.

1. Kopíruje se vždy jen originální sekvence, nedochází tedy na rozdíl od můstkové amplifikace ke kopírování kopie → nízký bias způsobený PCR amplifikací
2. Žádný index hopping (Ano, ač to nerada připouštím, v sekvenacích na Illumině se rozmohl takový nešvar, a to přeskokování indexu, které nastává v důsledku fyzického začlenění indexu vzorku z jedné knihovny do fragmentu vzorku z jiné knihovny, a tím pádem dojde k chybnému přiřazení

sekvence mezi vzorky). Ups, ale lze tomu předejít využitím tzv. UDI adaptérů, kdy z každé strany sekvenovaného vlákna je jiný index, což umožňuje filtrovat sekvence, u kterých došlo k index hoppingu. Více si můžete počíst zde [3] a zde [4].

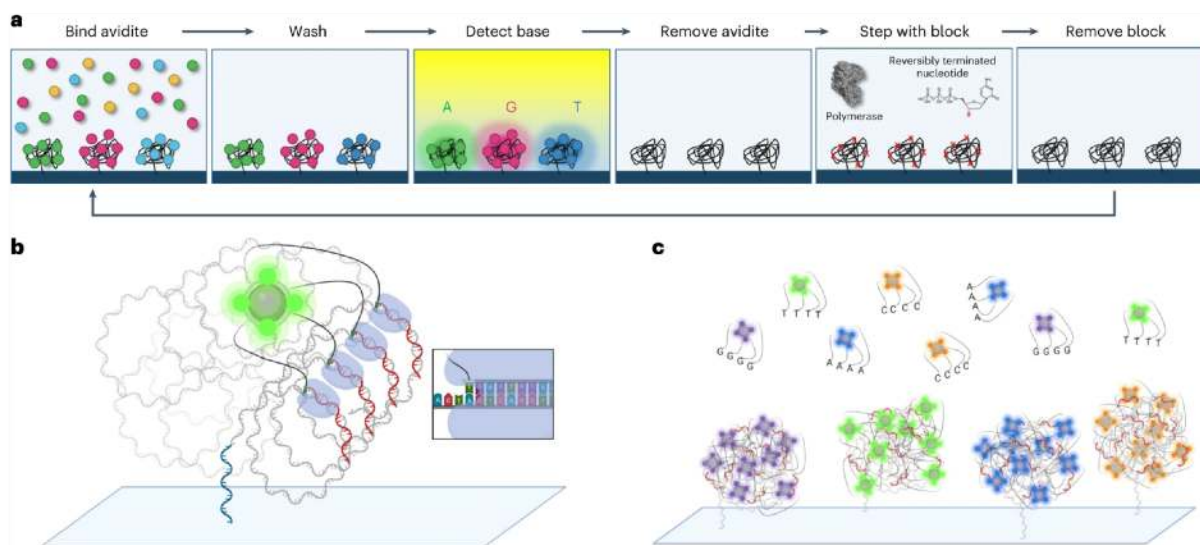
3. Žádné PCR duplikáty (i s nimi se šlo poprat využitím tzv. UMI adapterů, kdy má každý adapter svůj individuální molekulární barcode, a tedy když se naliguje na sekvenci ještě před amplifikací, pomůže odlišit právě duplikáty vzniklé amplifikací od vzácných variant. Více se můžete podívat zde [5].)

Pokud se bojíte, že s využitím některé z nových platforem si budete muset zvykat na nový způsob přípravy knihoven, tak vás mohu s klidným srdcem uklidnit. Většinu knihoven majících na svých koncích oblasti P5 a P7 (tedy knihovny sekvenující se na Illumině) lze snadno konvertovat a použít. Ale samozřejmě pokud by si to vaše srdce žádalo, můžete si pořídit i kity na přípravu knihoven přímo daného výrobce. Pokud použijete knihovny, které mají Nextera nebo TruSeq indexy, nemusíte ani přidávat primery pro čtení indexů, jsou již součástí kitů.

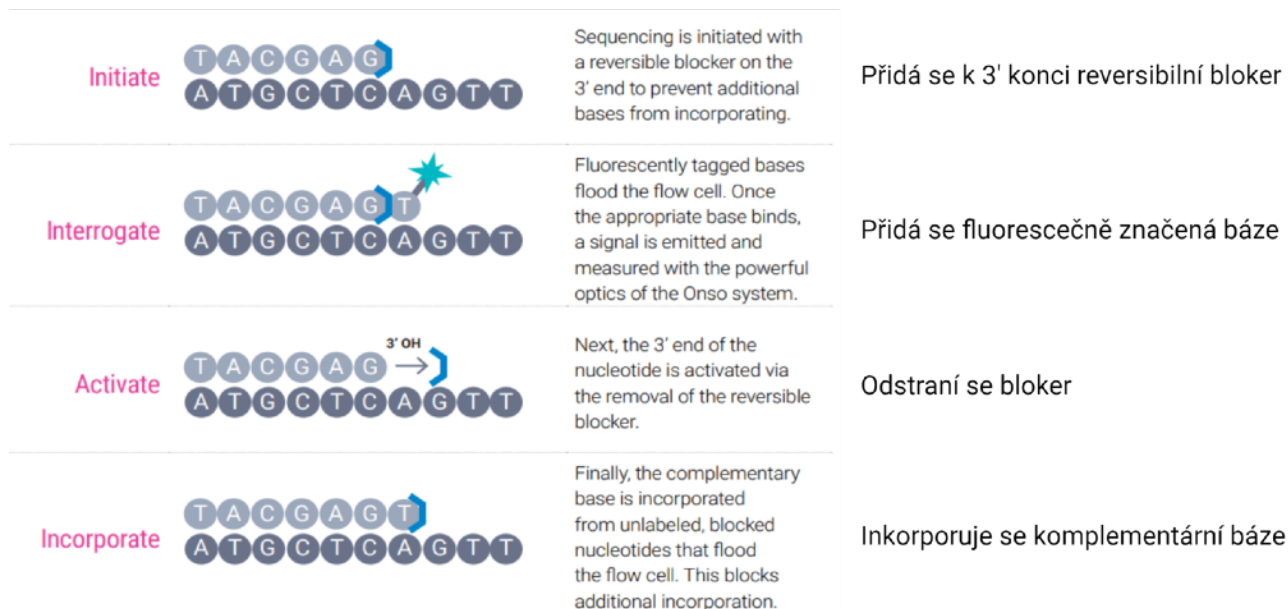
Ačkoliv k naamplifikování fragmentu všechny tyto nové technologie používají RCA, jak jsme si již výše psali, je v jednotlivých technologiích rozdíl, což přináší své výhody i nevýhody. U AVITI RCA probíhá v přístroji, kde se cirkularizovaná knihovna přichytí k navázaným oligonukleotidům na flowcell, vzniknou tzv. polonies. U MGI klonální amplifikaci provedete ve svém obvykle neobvyklém cyklu, a vytvoříte si tzv. nanoballs. Ty následně sami či s pomocí speciálního loadovacího přístroje nanesete na flowcell, která je paternovaná, tedy jsou na ni spoty (+ náboj), na které se přichytí negativně nabitá DNA. Díky tomu je (prý) velmi těžké přeladovat knihovnu (dát větší koncentraci než bylo v úmyslu, a tím si pokazit sekvenační běh), a nemusíte tedy být tak opatrní při správném stanovování koncentrace. U ONSA vám prozradím jen to, že amplifikace probíhá ve speciálním přístroji, a všechno ostatní je tajné! Tak ne že budete opisovat!

A jsme u detekce. U AVITI se používá tzv. Avidite, což je barvivem značený polymer s více nukleotidovými rameny nesoucími stejnou nukleotidovou bázi. Upravená polymeráza váže primer hybridizované polony a aviditové nukleotidové rameno bez inkorporace nebo extenze. Mnoho ramen se váže na oblasti hybridizované s primerem, a vytváří tak ultrastabilní multivalentní komplex. Na základě párování bází váže polymeráza správnou avidite ke každé poloně, viz. Obrázek č. 2. A protože nepotřebujete tolik značených nukleotidů, měla by sekvenace vyjít levněji. Teoreticky.

Obrázek č. 2 - Vazba Avidite k poloně (převzato z [6])



Díky bohu MGI detekuje pomocí fluorescenčně značených nukleotidů s terminátorem stejně jako Illumina, takže to můžu přeskocit, to si můžete najít ve starším čísle Mikrobio(m)novin. Ale u velmi precizně sekvenujícího ONSA se tomu nevyhnu, ač okénko opět nabírá biblických rozměrů. Ale víte co? Já vám to řeknu Obrázkem č. 3.



Obrázek č. 3 – Detekce nukleotidů u platformy ONSO [7]

Slibuji, že se již blížíme ke konci. Získali jsme od všech přístrojů read 1, read 2 i sekvence obou indexů. Výsledky jsou FastaQ soubory podobné těm, na které jste zvyklí z Illuminy, přesto si některé softwary neporadí s trochu jinou hlavičkou, ale s tím se dá po poradě s aplikačním specialistou daného přístroje něco udělat (alias Jak nafingovat Illuminí hlavičku v deseti krocích).

A posledních pár zajímavostí, a už vás nechám vydechnout, na mou duši, na psí uši, na kočičí svědomí.

Délka čtení je u všech přibližně stejná jako u Illuminy; nejdelší čtení jsou 2x300 bp.

- AVITI i MGI mají možnost jet dva nezávislé runy najednou. Zahájit druhý run jde po většinu času sekvenace prvního runu.
- MGI nemá zatím možnost sledovat sekvenaci „on-line z domova“.
- U MGI se může každá lajna loadovat samostatně. Jedna flowcell se 4 lajnami tedy může obsahovat 4 knihovny se stejnými indexy.
- AVITI má flexibilní flowcell. Jde tam naspotovat leccos, zatím klasická oliga pro sekvenování, ale do budoucna se počítá s tím, že půjde dělat obohacené knihovny přímo na flowcell.”

Nástup těchto přístrojů na trh prospěje nám všem, protože jak víte z nenavštívených kurzů ekonomie, konkurence tlačí cenu dolů. A zatím to vypadá, že tato konkurence produkuje minimálně stejně kvalitní sekvence, jako Illumina, a proto by měly být i zaměnitelné. Tedy ne, že bych doporučovala být promiskuitní, a v rámci jednoho projektu vystřídat všechny novinky, ale teoreticky by až na drobné odchylky v kvalitě nemělo ve většině případů dojít k nějakým fatálním nesrovnalostem. Teoreticky.

A za to, že jste vydrželi číst až do konce, ode mne dostanete jako dárek ojedinělé optimistické rozloučení. Konkurence v sekvenačních platformách může být důvod, proč o střevním mikrobiomu budeme vědět víc než h...o, pardon, STOLICI.

Petra Vídeňská

[1] Mardis, Elaine R. "The impact of next-generation sequencing technology on genetics." *Trends in genetics: TIG* vol. 24,3 (2008): 133-41. doi:10.1016/j.tig.2007.12.007

[2] <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/an-overview-of-next-generation-sequencing-346532>

[3] Southard-Smith, Austin N et al. "Dual indexed library design enables compatibility of in-Drop single-cell RNA-sequencing with exAMP chemistry sequencing platforms." *BMC genomics* vol. 21,1 456. 2 Jul. 2020, doi:10.1186/s12864-020-06843-0

[4] https://knowledge.illumina.com/library-preparation/general/library-preparation-general-reference_material-list/000002344

[5] <https://help.geneiousbiologics.com/hc/en-us/articles/4781289585300-Understanding-Single-Cell-technologies-Barcodes-and-UMIs>

[6] Arslan, Sinan et al. "Sequencing by avidity enables high accuracy with low reagent consumption." *Nature biotechnology* vol. 42,1 (2024): 132-138. doi:10.1038/s41587-023-01750-7

[7] <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Onso-brochure.pdf>



Mikrobio(m)novinky

Mikrobiom městských ekosystémů

V moderní době, kdy se města rozrůstají rychlejším tempem než kdykoliv předtím, zvyšuje se význam v oblasti životního prostředí, zdraví a udržitelnosti, se stává zkoumání vlivu měst na přírodní ekosystémy naléhavějším než kdy jindy.

V tomto kontextu bychom chtěli upozornit na zajímavý přístup ve výzkumu, jak urbanizace ovlivňuje městská mikrobiální společenství. Američtí vědci [1] se nečekaně obrátili ke včelám, těm nejmenším obyvatelům měst, aby odhalili tajemství městských mikrobiomů. Ty jsou klíčové z několika důvodů. Ovlivňují kvalitu vzduchu, zdraví rostlin, ale i šíření nemocí v městských



prostředích. Včely se ukázaly být skvělými bioindikátory, protože sbírají během svých výletů v okruhu cca tří kilometrů kolem úlu všechny možné mikrobiomy jak ze vzduchu, tak z rostlin, půdy i lidí, což odráží kvalitu prostředí a biodiverzitu jejich městských lokalit. Při zaměření se na virulentní faktory lze tyto informace také využít ke sledování epidemiologicky významných agens jak pro samotné včely, tak i pro lidskou populaci. V rámci této studie se pozornost soustředila na širokou škálu měst, včetně Sydney a Melbourne, které jsou známé svou rozsáhlou zelení, Benátky s jejich unikátními vodními cestami, Brooklyn, který představuje hustě osídlenou městskou část New Yorku, a Tokyo, metropoli známou svým rychlým tempem života a technologickým pokrokem. Rozmanitost a složení mikrobiomů těchto měst se široce lišila, což odráží jedinečné environmentální, kulturní a geografické charakteristiky každého města. Proměnlivost městských mikrobiomů není náhodná. Tato variabilita zdůrazňuje nejen přizpůsobivost a adaptaci, ale i odolnost či dokonce negativní odrazy mikrobiálních společenství v reakci na urbanizaci a lidské aktivity. Ze studie vyplývá, že města, která investují do zelených ploch a udržitelného plánování, mohou nejen zlepšit kvalitu života svých obyvatel, ale také podpořit bohatou mikrobiální diverzitu, která je klíčem k udržitelnému zdraví městských ekosystémů.

Městské mikrobiomy nejsou jen pasivními obyvateli našich měst, ale aktivními účastníky, kteří formují zdraví a udržitelnost městských ekosystémů. Je na čase porozumět jejich hodnotě a dynamice, je čas zamyslet se nad tím, jak můžeme tyto systémy ochraňovat a využívat ve prospěch širšího společenského zdraví.

Eliška Pivrcová





Rozvoj viromu u dětí

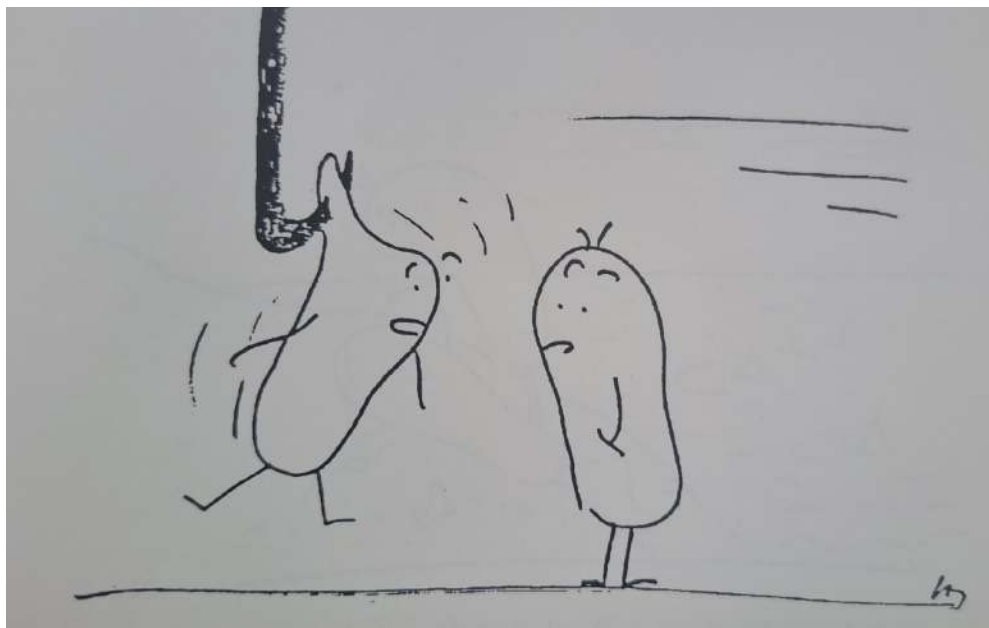
V dnešní době již málokdo pochybuje o vlivu složení mikrobiomu na zdraví člověka a o tom, že jedním z nejdůležitějších období, kdy se rozvíjí a ustanovuje tento mikrobiom, jsou první tři roky života. Dosud se ale většina prací zabývala bakteriálním složením. Díky rozvoji technologií a nebývalému úsilí mnoha vědců se do popředí zájmu dostává i znalost o zastoupení jednotlivých virů, tzv. virom. Studie autorů Zheng et al., 2024, [2] popisuje současné znalosti o virové diverzitě v prvních letech života. Sleduje pestrost vlivů a faktory, které formují složení lidského střevního viromu v průběhu času. Autoři zjistili, že podobně jako u bakterií množství a diverzita virů (a především bakteriofágů, kteří tvoří majoritu viromu) do tří let roste. Také byla po porodu pozorována velká variabilita mezi jedinci, která ale postupně klesala. Rovněž se potvrdilo, že virom ovlivňují obdobné faktory, jako bakteriom (způsob porodu, zaváděná potrava apod.), ale přesný mechanismus není znám. A protože jsme si v těchto Mikrobi(m)novinách již pověděli mnoho zajímavostí o biofilmu, ani zde nemůžeme přeskocit zmínku, že prostředí ve střevě může ovlivňovat interakce mezi fágy a bakteriemi, a regulovat tak expresi bakteriálních genů potřebných pro formaci biofilmu. V rámci studie byl také připraven katalog dětského střevního viromu, který může sloužit jako zdroj informací, a může pomoci odhalit souvislosti mezi střevním viromem a zdravím kojenců.

Hana Sechovcová

[1] Hénaff, Elizabeth et al. "Holobiont Urbanism: sampling urban beehives reveals cities' metagenomes." *Environmental microbiome* vol. 18,1 23. 30 Mar. 2023, doi:10.1186/s40793-023-00467-z

[2] Zeng, Shuqin et al. "A metagenomic catalog of the early-life human gut virome." *Nature communications* vol. 15,1 1864. 29 Feb. 2024, doi:10.1038/s41467-024-45793-z

Mikrobio - humor



Co na mne tak hloupě zíráš? Tak pomůžeš mi dolů z toho receptoru?

Velké poděkování patří rodině pana Leoše Mandela za svolení ke zveřejnění laskavého mikrobiálního kresleného humoru a také RNDr. Iljovi Trebichavskému, CSc., který obrázky Leoše Mandela shromáždil a knižně vydal.

Redakční rada

Mikrobio(m)novin:

doc. RNDr. Monika Cahová, Ph.D.,
Mgr. Lucie Najmanová, Ph.D.,
MUDr. Jakub Hurych,
Mgr. Petra Vídeňská,
Ph.D., Ing. Mgr. Hana Sechovcová,
Mgr. Eliška Pivrcová,
MUDr. Jiří Vejmelka

Grafické zpracování:

Mgr. Michaela Bartoňová
www.michaelabartonova.cz

ISSN 3029-5409

Vychází 4-6x/rok

Některá ilustrační foto jsou
generovaná na Ai

Těšíme se na vaše reakce,
podněty a zajímavé příspěvky,
které můžete zasílat na adresu:
cms@mikrobiom-cms.cz

