



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Molekulární metody stanovení mikrobiálních diverzit těla savců

Estimation of body microbiome diversities of mammals by molecular genetic tools

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.
Konzultant práce: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

Renata Tarasová

Kladno, květen 2018

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Renata Tarasová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Molekulární metody stanovení mikrobiálních diverzit těla savců**
Téma anglicky: Estimation of Body Microbiome Diversities of Mammals by Molecular Genetic Tools

Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude seznámení studenta s technikami stanovení mikrobiálních diverzit těla člověka a zvířat. Mikrobiální ekosystémy zvířat zásadním způsobem ovlivňují stav svého hostitele, jejich vztah může být komenzální, mutualistický nebo patogenní. Bakterie v trávicím traktu chrání před patogeny, produkují živiny rozkladem komplexních polymerů, účastní se imunitních reakcí.

Studentka se v rámci řešení práce seznámí a prakticky zvládne techniky izolace nukleových kyselin, amplifikace vybraných genů metodou PCR, elektroforetické separační techniky nukleových kyselin a stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE, včetně bioinformatických analýz nukleotidových sekvencí.

Studentka v rámci řešení práce vyhodnotí mikrobiální populaci na kůži prasečího modelu melanomu.

Seznam odborné literatury:

- [1] Grice EA , The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease, *Semin Cutan Med Surg* , číslo 33 (2), 2014, 98-103 s., ISSN: 1085-5629
- [2] Inglis GD, Thomas MC, Thomas DK, Kalmokoff ML, Brooks SPJ, Selinger LB , Molecular methods to measure intestinal bacteria: a review, *J AOAC Int* , číslo 95 (1), 2012, 5-20 s., ISSN: 1060-3271
- [3] Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI , Evolution of mammals and their gut microbes, *Science* 320, 2008, 1647-1651 s., ISSN: 0036-8075

Zadání platné do: 13.09.2019
Vedoucí: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.
Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

vedoucí katedry / pracoviště

děkan

V Kladně dne 02.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Molekulární metody stanovení mikrobiálních diverzit těla savců vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2018

.....
Renata Tarasová

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat paní RNDr. Taťáně Jarošíkové, CSc. za podnětné připomínky a odborné vedení práce, panu Ing. Jakubu Mrázkovi, Ph.D. za trpělivost a cenné rady při zpracování praktické části. Dále patří velké poděkování všem pracovníkům Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky za možnost zúčastnit se projektu, který byl podpořen grantem CIGA 20162019 Grantové agentury České zemědělské univerzity v Praze, dále Projektem Excellence CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000460 a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (číslo projektu LO1609), díky nimž mohla být realizována praktická část bakalářské práce.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu během celého studia.

Abstrakt

Normální kožní mikrobiom je přítomen na zdravé kožní tkáni. Za fyziologického stavu si zachovává svou typickou bakteriální skladbu, specifickou pro každého člověka. Předpokládá se, že změny v jeho složení mohou nastat v souvislosti s výskytem nádorové tkáně. Předkládaná práce si dává za cíl stanovit diverzity mikrobiomu a nalézt nové možnosti léčby melanomu. Tímto výzkumem se zabýval Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, který ke sledování využil modelové organismy, konkrétně animální model liběchovských miniprasat.

Celkem bylo odebráno 90 vzorků z povrchu melanomu, středu melanomu a kůže v jeho okolí u zvířat ve věku 6., 8., 10., a 12. týdnů. Pro účely této práce byly vyhodnoceny vzorky melanomové a kožní tkáně odebrané v 10. týdnu věku zvířete. K analyzování mikrobiomu byly využity metody molekulární biologie. Nejprve byla ze seškrabů obou typů tkání izolována DNA, která byla následně amplifikována pomocí PCR. Primery použité k amplifikaci ohraničovaly V3 oblast genu 16S ribozomální RNA. Úseky DNA byly rozděleny metodou denaturační gradientové gelové elektroforézy a po vizualizaci fragmentů bylo 48 z nich vybráno a komerčně osekvenováno. Nukleotidové sekvence vzorků byly zpracovány v programu Geneious a následně porovnány algoritmem BLAST s databází nukleotidových sekvencí genu pro 16S ribozomální RNA.

Porovnáním získaných výsledků jsme zjistili diverzity bakteriálních druhů mezi vzorky kůže a melanomu. Melanomová tkáň vykazovala výrazně zvýšený výskyt bakterií *Fusobacterium* a *Trueperella*, které se fyziologicky na kůži nevyskytují. Průkazem těchto rodů na melanomu tak můžeme předpokládat, že se jedná o bakterie, jejichž výskyt je vázán na nádorovou tkáň. Zhodnocení mikroorganismů vyskytujících se na melanomové tkáni a kůži v jejím okolí by mohl znamenat posun při diagnostice nebo terapii tohoto druhu rakoviny kůže.

Klíčová slova

MeLiM; kožní mikrobiom; melanom; PCR-DGGE; 16S rRNA

Abstract

Normal skin mikrobiom is present on healthy skin tissue. In physiological condition, retains its typical bacterial composition, identical for each person. It is assumed that changes in its composition can occur in relation to the occurrence of tumour tissue. The thesis aims to determine the diversity of microbiome and to find new possibilities of treatment of melanoma. This research was dealt with by the Institute of Animal Physiology and genetics of the ASCR, which used to monitor the model organisms, namely the model of Libechov Minipigs.

In total, 90 samples were taken from the surface of melanoma, the centre of melanoma and the skin in the vicinity of animals aged 6, 8, 10, and 12 weeks. For the purpose of this work, the samples of melanoma and skin tissue collected in 10th week of age of the animal. Molecular biology methods were used to analyze microbiome. At first, DNA was isolated from the cutaneous scrapings of both types of tissue, which was subsequently amplification of PCR. Primers used to amplification specifically targeting V3 region of the 16S ribosomal RNA gene. DNA fragments were divided by the method denature gradient gel electrophoresis and after visualization of the fragments, 48 of them was selected and commercially sequenced. Nucleotide sequence samples were processed in the Geneious program and then compared by the BLAST algorithm with the nucleotide sequencing gene database for 16S ribosomal RNA.

By comparing the results obtained we found the diversity of bacterial species between skin samples and melanoma. Melanoma tissue showed a significantly increased incidence of bacteria *Fusobacterium* and *Trueperella*, which are not physiologically present on the skin. The demonstration of these genera in melanoma can therefore assume that occurrence of these bacteria is bound to the tumor tissue. The evaluation of the microorganisms occurring on the melanoma tissue and the skin around it could mean a shift in the diagnosis or therapy of this type of skin cancer.

Keywords

MeLiM; skin mikrobiome; melanoma; PCR-DGGE; 16S rRNA

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav.....	10
2.1	Fyziologická flóra lidského těla	10
2.1.1	Složení bakteriální flóry.....	10
2.1.2	Biofilm	11
2.1.3	Fyziologické osídlení kůže.....	12
2.1.4	Mikrobiální osídlení gastrointestinálního traktu	14
2.2	Genetická informace mikroorganismů	16
2.3	Kožní mikrobiom melanomů a melanocytárních névů	17
2.4	Melanom.....	17
2.4.1	Kožní melanomy	18
2.4.2	Slizniční melanomy.....	18
2.4.3	Uveální melanomy	18
2.4.4	Primární melanomy CNS	18
2.4.5	Melanocyty.....	19
2.4.6	Vznik névu	19
2.4.7	Charakteristika primárního kožního melanomu.....	20
2.4.8	Diagnostické metody vyšetření melanomu u lidí.....	21
2.5	Modelový organismus pro výzkum	21
2.6	Molekulární metody studia mikroorganismů	23
2.6.1	Metody izolace DNA	23
2.6.2	Stanovení koncentrace a kvality DNA.....	25
2.6.3	Amplifikace DNA	25
2.6.4	Elektroforetická separace nukleových kyselin.....	27
2.6.5	Sekvenování nukleových kyselin.....	29
3	Cíl práce.....	33
4	Metodika	34

4.1	Skupina analyzovaných zvířat	34
4.2	Odběr biologického materiálu	34
4.2.1	Seškraby z melanomu a kůže	34
4.3	Izolace DNA	35
4.4	Amplifikace genu kódujícího 16S rRNA	36
4.5	Agarózová elektroforéza	38
4.6	Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE	38
4.6.1	Příprava DGGE gelu	38
4.6.2	Spuštění DGGE	40
4.6.3	Ukončení DGGE	40
4.6.4	Sekvenace DNA fragmentů z DGGE	40
4.7	Analýza sekvencí	41
5	Výsledky	43
5.1	Izolace DNA	43
5.2	Agarózová elektroforéza	45
5.3	Denaturační gradientová gelová elektroforéza	45
5.4	Bioinformatická analýza nukleotidových sekvencí	46
5.5	Přehled identifikovaných mikroorganismů	47
6	Diskuze	52
7	Závěr	55
8	Seznam použitých zkratk	56
9	Seznam použité literatury	58
10	Seznam použitých obrázků	63
11	Seznamu použitých tabulek	64

1 ÚVOD

Metody molekulární biologie již nejsou dnes doménou pouze vědeckých pracovišť, ale velmi často se setkáváme s jejich aplikací i v klinické laboratorní praxi, kde použití metod molekulární biologie umožní zjistit o nemocích, jejich stádiu a léčbě mnohem přesnější informace, než tomu bylo dříve. Pomocí těchto metod je možné onemocnění diagnostikovat v rámci tzv. diagnostického okna, kdy se ještě nevytvořilo dostatečné množství protilátek na průkaz standartními imunologickými metodami, nebo patogeny identifikovat na základě sekvence DNA.

Téma výzkumu zhoubných novotvarů je velmi aktuální, protože jím v České republice onemocní ročně více než 94 000 lidí (2015). A přestože se objevují nové metody v léčbě onkologických pacientů, jako je biologická či protonová léčba, není pro 27 000 lidí ročně tato léčba úspěšná (Česká republika a rakovina v číslech, 2011).

Jeden z aspektů výzkumu nádorového onemocnění je jeho souvislost s mikrobiální flórou. Tímto se již pár let zabývají zahraniční vědecká pracoviště, která se specializují zejména na nádory střev či kolorektální karcinom.

Jedním z pracovišť v ČR, které se věnuje výzkumu nádorových onemocnění je Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR. Zabývá se výzkumem melanomu, a to speciálně mikrobiálním osídlením melanomu na modelu *miniprasat*. Důvodem je, že v České republice se každý rok diagnostikuje přibližně 2 400 nových pacientů s melanomem. Přestože se dá léčit, tak každý rok na tento typ rakoviny 450 pacientů umírá (Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017).

Organismus *miniprasat* se částečně podobá lidskému, a proto je vhodným modelem pro výzkum léčby melanomu. U některých modelů došlo ke spontánní regresi, která potlačila růst nádoru a *miniprase* se vyléčilo. Vědci se nyní zabývají tím, jaké mechanismy se spolupodílejí na tomto zvratu v nemoci a zda svou roli v regresi nehraje i mikrobiální flóra. Zda se po objasnění spontánní regrese změní léčba melanomu u lidí zatím není jasné, nicméně studium mikroflóry novotvarů může v průběhu let možnosti onkologické terapie ovlivnit (Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017).

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Fyziologická flóra lidského těla

Bakteriální osídlení lidského těla je nezbytné pro zdraví a vývoj člověka. Složení bakteriální mikroflóry je individuální a charakteristické pro momentální zdravotní stav jedince. Fyziologická mikroflóra je ovlivněna řadou faktorů. Nejčastěji se jedná o věk, geografickou lokalitou, ale také používání osobních hygienických prostředků (mýdlo, deodorant). Významným faktorem je i dieta. Pokud bude při dietním stravování například zvýšen příjem železa, v intestinálním traktu se budou objevovat bakterie schopné tyto minerály využívat. Odhaduje se, že v těle zdravého člověka lze nalézt až 1 500 bakteriálních druhů. Nejosídlenější částí lidského těla je zažívací trakt, konkrétně střevo. Další v pořadí je mikroflóra kůže, ústní dutiny, horních cest dýchacích, vagíny a očí. Krevní oběh nebo vyšší části močového traktu by měly být sterilní (Julák, 2006; Murray, 2016).

Bakterie, osidlující tělo hostitele, zajišťují ochranu před nežádoucími patogeny, nezbytné metabolické funkce a stimulují imunitu. Hostitel poskytuje bakteriím místo pro jejich kolonizaci, výživu a ochranu před nežádoucími druhy (nespecifická imunitní odpověď). Pokud dojde k narušení mikroflóry běžných bakterií, mohou organismus kolonizovat jiné bakterie, které jsou za normálních okolností neškodné. Vznikne tzv. superinfekce, která může být důsledkem antibiotické léčby (Mikroflóra lidského organismu, 2018; Murray, 2016).

Kromě bakterií osidlují fyziologicky lidské tělo i houby a další mikroorganismy, které jsou pro zdravého člověka neškodné, mohou být dokonce prospěšné. Všechny tyto organismy označujeme jako „normální flóru“ (Richard A. Harvey, 2007).

Společenstva mikroorganismů zdravých lidí a zvířat vytváří ve vnitřních prostorech a na zevním povrchu normální mikrobiální flóru. Normální virová mikroflóra zatím nebyla charakterizována a její existence je diskutabilní (Hamplová, 2015).

2.1.1 Složení bakteriální flóry

Bakteriální osídlení lze rozdělit na autochtonní a alochtonní. Původní bakteriální druhy charakteristické pro zdravý organismus nazýváme autochtonními. Alochtonní organismy se

objevují nepravidelně. Obvykle se vyskytují po narušení autochtonní flóry vnějším zásahem. Může se jednat například o radiační ozáření nebo podání antibiotik (Julák, 2006).

Mikroorganismy přítomné na sliznicích a kůži lze rozdělit do dvou skupin. První z nich je skupina rezidentních organismů, jejichž výskyt je podmíněn oblastí a věkem. Vyskytují se však pravidelně a zachovávají si schopnost rychlé obnovy. Krátkodobě nepatogenní flóru vytváří transientní organismy. Na těle se vyskytují krátce, v rádech dnů až týdnů. Svůj význam mají v případě, kdy je porušena normální mikroflóra a způsobují onemocnění (Julák, 2006; Hamplová, 2015).

Bakteriální osídlení dvou blízkých lokalit nemusí být vždy stejné. Jako příklad lze uvést dutinu ústní, kde ve slinách žijí aerobní bakterie a pod zubním plakem, v anaerobním prostředí, nalezneme zcela odlišné druhy. Často se však sousední oblasti vzájemně ovlivňují. Typické je to například pro kožní flóru ovlivňující vaginální osídlení (Julák, 2006).

Rozložení jednotlivých druhů bakterií závisí na jejich schopnosti tolerovat rozdílná prostředí lidského těla (pH, minerály, koncentrace solí a kyslíku). Právě kvůli nedostatku kyslíku kolonizují většinu těla anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie (Murray, 2016).

Zřídka se objevují bakteriální druhy, které osidlují lidské tělo ve větším počtu. Takovýchto kmenů se objevuje jen několik desítek a pro správné fungování organismu je důležité, aby byly v dané lokalitě v rovnováze s minoritními druhy, které mohou být i přes své stopové množství potenciálními patogeny. Naopak některé bakterie, které jsou fyziologicky velmi rozšířené a tvoří rezidentní mikroflóru, např. viridující streptokoky horních cest dýchacích, mohou při průniku do krevního oběhu a dále do srdce způsobit endokarditidu. Takovéto onemocnění nazýváme oportunní infekcí (Hamplová, 2015; Julák, 2006).

2.1.2 Biofilm

Rezidentní mikroflóra lidského organismu se vyskytuje ve dvou formách. Menší zastoupení má mikroflóra planktonická, rozptýlená v tekutinách. Častěji mikroorganismy adherují na povrch kůže a sliznic, kde vytváří mikrokolonie podobné koloniím na kultivačních půdách. Biofilm vytváří mikroorganismy se změněným fenotypem

a růstovými vlastnostmi. Pokud dojde k vytvoření kolonie bakteriemi bez změněného fenotypu, nelze hovořit o biofilmu (Julák, 2006; Schindler, 2014).

Jako biofilmy označujeme komplexní povlaky rezidentní mikroflóry vytvářející se na povrchu tvořeném epiteliálními buňkami nebo inertním organickým i anorganickým povrchu. Nejsou přítomny pouze na lidském těle, ale i na implantátech, kanylách apod. Biofilm se začíná tvořit v okamžiku, kdy bakterie pomocí své povrchové struktury (fimbrie, glykopeptidy) adheruje na povrch a vytváří mikrokolonii, která se dále dělí a rozrůstá (Julák, 2006).

Bakterie po přichycení změny vlastnosti a začnou produkovat polysacharid, ve kterém se buňky drží a rozmnožují. Na specifický signál se bakterie odtrhnou z biofilmu a jsou odneseny proudem okolní tekutiny nebo vlastními pohybovými orgány na jiné místo, které následně kolonizují (Schindler, 2014).

Vzhledem k tomu, že je biofilm ekosystém různých druhů bakterií, panují zde podobné vztahy jako u soužití vyšších organismů. Tyto vztahy mohou být prospěšné pro všechny a takovéto soužití se bude nazývat komensalismus. Pokud bude mezi druhy konkurence, bude se hovořit o amensalismu. Jestliže mezi sebou nebudou jednotlivé druhy interagovat, bude jejich soužití nazýváno neutralismem (Julák, 2006).

Nejznámějším a nejdříve objeveným biofilmem lidského těla je zubní plak. Vyskytuje se na zubech fyziologicky a i po odstranění se znovu vytváří. Významnější roli mají biofilmy při infekcích, jako je například endokarditida. Nejčastěji koky vytvářející biofilm osidlují chlopeň a společně s fibrinem vytváří vegetaci. Cystická choroba je dědičná choroba, která je provázena opakovanými infekcemi dýchacích cest. V pokročilém stádiu dochází v důsledku těchto infekcí k poškození epitelu, na který se usazuje biofilmem *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm se vytváří také při bércových vředech, na povrchu popálených ploch a při chronických zánětech prostaty (Schindler, 2014).

2.1.3 Fyziologické osídlení kůže

Kůže je druhým bakteriemi nejvíce osídleným místem lidského těla. Na 1 cm² žije průměrně 2 000 aerobních bakterií. Na místech, kde je vyšší vlhkost nebo se jedná o kožní záhyby je tento počet až 40× vyšší. Předně se jedná o podpaždí, rozkrok, v rýze pod prsy a u velmi obézních lidí v místech převisu břicha. Bakterie se nachází na povrchu, ve

vlasových folikulech i mazových a potních žlázkách. Mikroprostředí těchto lokalit společně s tvorbou biofilmů umožňuje přežívání anaerobních bakterií, např. rodu *Propionibacterium* (Mikroflóra lidského organismu, 2018; Julák, 2006).

Kůže je významná součást nespecifické imunity. Představuje mechanickou i chemickou bariéru. Mechanicky působí především keratin, který není většina bakterií schopna degradovat. Významným ochranným mechanismem je kyselé pH, jehož hodnoty se pohybují od 4,2 až 5,5 v různých částech těla. Bakterie a kožní žlázy produkují substance, které hodnotu pH snižují. Složky humorální i buněčné imunity, mastné kyseliny i vysoká koncentrace chloridu sodného vytváří na kůži antibakteriální prostředí (Julák, 2006).

I když je kůže prakticky neustále v kontaktu s vnějším prostředím, neumožňuje přežití všech organismů. Nejčastějšími zástupci kožní mikroflóry jsou grampozitivní bakterie rodu *Staphylococcus*, zejména *Staphylococcus epidermidis* a další koaguláza-negativní bakterie tohoto rodu, které se vyskytují především ve vnějších vrstvách kůže. *Propionibacterium acnes* se nachází v hlubších vrstvách kůže, vlasových folikulech, mazových a potních žlázkách. Dále se na kůži nachází rody *Micrococcus*, *Sarcina* a *Corynebacterium*. *Clostridium perfringens* lze izolovat na kůži až 20 % zdravých jedinců. Není pravidlem, že všichni zástupci stejného rodu jsou příslušníky fyziologické flóry. Například *Staphylococcus aureus* je původcem závažných kožních onemocnění. *Staphylococcus epidermidis* může kolonizovat katetry a způsobovat infekce krevního oběhu. Součástí kožní mikroflóry nejsou pouze bakterie, ale i kvasinky a plísně. *Candida albicans* a další houby rodu *Malassezia* se nacházejí zejména na vlhkých místech kůže. Gramnegativní tyčky obvykle nekolonizují povrch kůže (s výjimkou rodu *Acinetobacter*), neboť kůže je příliš suchá (Julák, 2006; Murray, 2009; Richard A. Harvey, 2007).

Využití znalosti kožní mikroflóry k diagnostice a léčbě nemocí

Moderní techniky identifikace mikrobiálních komunit umožňují identifikovat změny, které souvisí s onemocněním kůže. Může se jednat o psoriázu, dermatitidy či akné. Předpokládá se, že znalost kožního mikrobiomu bude sloužit jednak k diagnostice, ale i k terapii daného onemocnění (Grice, 2014).

Dříve byla identifikace mikrobiomu založena na kultivaci bakterií na půdách. Tyto metody nebyly tak přesné. V dnešní době se charakterizují bakterie pomocí metody

sekvenování DNA, která analyzuje mikrobiom ve srovnání se staršími metodami mnohem přesněji. K identifikaci se využívá sekvence bakteriálního genu 16S pro ribozomální RNA. V tomto genu se nachází variabilní oblasti, ve kterých jsou specifické sekvence typické pro určitý bakteriální druh. Srovnáním s referenčními databázemi lze identifikovat bakteriální původ (Grice, 2014).

Je známo, že mikroflóra souvisí se zdravím i nemocemi lidského těla. V dnešní době se pro svůj přínos, například při léčbě antibiotiky, užívají probiotika v gastrointestinálním traktu. Probiotika jsou živé organismy, nejčastěji bakterie či kvasinky, jejichž růst podporují substráty nazývané prebiotika. Pro mikrobiom kůže je nutné provést ještě řadu výzkumů k identifikaci vhodných substrátů a probiotických kmenů, které budou prospěšné pro bakteriální společenství pokožky (Grice, 2014).

2.1.4 Mikrobiální osídlení gastrointestinálního traktu

Fyziologická mikroflóra gastrointestinálního traktu označuje soubor mikroorganismů přítomných v trávicím traktu zdravého jedince. Vlivem nemoci či léčby se mohou tyto mikroorganismy stát patogeny. Trávicí trakt je osídlen 10^{12} – 10^{14} mikrobiálními zárodky. Jedná se o variabilní soubor druhů lišících se kvalitativně i kvantitativně s ohledem na geografickou oblast či stravovací návyky (Zbořil, 2005).

Bakteriální mikroflóra je v jednotlivých úsecích intestinálního traktu nerovnoměrně rozložena. Vzhledem k nízkému pH a žaludečním enzymům je v žaludku 10^1 – 10^3 mikroorganismů na gram žaludečního obsahu. Představy o úplné sterilitě žaludku ukončily v 80. letech minulého století hromadící se důkazy o výskytu bakterie *Helicobacter pylori*, který je považován za příčinu vředové choroby a prekancerózní stav. Podobně málo jako žaludek je osídlené i duodenum. Naopak nejosídlenějším místem trávicího traktu je kolon, kde je až 10^{12} mikroorganismů na gram střevního obsahu. Kvantitativní zastoupení je taktéž v jednotlivých oddílech odlišné. Obecně lze říci, že směrem k aborálním oddílům roste podíl aerobních mikroorganismů a klesá počet anaerobních. V tlustém střevě tvoří nejpočetnější skupinu rod *Bacteroides*. U dětí je dominantní *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Lactobacillus acidophilus*. U dospělých *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bacterium* a *Lactobacillus salivarius*. Další bakteriální rody a kmeny žijící v intestinálním traktu popisuje Tabulka 1 (Zbořil, 2005; Richard A. Harvey, 2007; Mikroflóra lidského organismu, 2018; Ley, 2008).

Tabulka 1: Osídlení trávicího traktu mikroorganismy (Zbořil, 2005; Bednář, 1999)

Oddíl trávicího traktu	Zástupci mikroflóry intestinálního traktu
Ústní dutina, zuby	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Actinobacteria</i>
Žaludek a duodenum	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , kvasinky
Jejunum a ileum	<i>Lactobacillus</i> , koliformní bakterie, <i>Streptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Fusobacterium</i>
Kolon	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , koliformní bakterie, <i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , kvasinky

Postupná převaha anaerobních mikroorganismů v jednotlivých oddílech trávicího traktu vytváří podstatnou strukturální změnu. Fakultativní anaeroby, kterým dominuje *Escherichia coli*, spotřebovávají kyslík, který by byl pro anaeroby, citlivé na jeho přítomnost, smrtelný. Tyto dvě skupiny jsou na sobě takto existenčně závislé. Při poškození aerobů dochází následně k poškození i anaerobní skupiny mikroorganismů (Zbořil, 2005).

Střevní mikroorganismy zajišťují mikrobiální bariéru před patogeny, produkují látky ovlivňující funkci střev, stimulují imunitní střevní systém, produkují vitamíny a redukují bakteriální translokace. Nejpočetnější skupinou mikroorganismů v tlustém střevě jsou rody *Bacteroides* a *Bifidobacterium* (Hamplová, 2015; Zbořil, 2005).

Vývoj a změny fyziologické mikroflóry trávicího traktu v průběhu života

Mikrobiální kolonizace trávicího traktu novorozence je ovlivněna řadou faktorů. Důležitou roli hraje věk dítěte (předčasný porod) a způsob porodu. Vaginální mikroflóra totiž podstatně ovlivňuje kolonizaci dítěte mikroorganismy. Dalšími faktory jsou strava, geografická poloha a hygiena (Adamcová, 2010).

Trávicí trakt plodu v těle matky je prostý mikroorganismů. K jeho osídlování dochází až v prvních dnech života zejména orální cestou. Nejprve je osídlován žaludek, později střevní část trávicího traktu. Hlavním zdrojem mikroorganismů je kožní, ústní a nosní mikroflóra matky. Prvními organismy jsou fakultativní anaeroby jako například *Escherichia coli*, dále pak rody *Enterococcus*, *Lactobacillus* a *Staphylococcus*. Tyto bakterie jsou dominantní čtrnáct dní po porodu, později je GIT osídlen rody *Bifidobacterium* a *Clostridium*, které jsou prekurzory pro kolonizaci dalšími anaerobními bakteriemi. Důležitou roli při vytváření

mikroflóry hraje kojení, při kterém dochází k dominanci anaerobů. V kojeneckém období dochází také k nárůstu skupin rodů *Enterobacterium* a *Bacteroides*. Kojené děti získávají od matky nejen různé druhy bakterií, imunoglobuliny, laktoferin, ale i prebiotika, která pozitivně stimulují osídlování trávicího traktu bakteriemi. Jsou schopny lépe zvládat enterální a urogenitální infekce než děti, kterým byla podávána náhražka mateřského mléka. Doba kojení ovlivňuje nejen mikroflóru. U dětí, které byly kojeny jen krátce, jsou popsány průjmy a výskyty potravních alergií. Složení mikroflóry dětí, jimž byla podávána náhradní strava, je podobnější dospělé mikroflóre. Pokud je u dětí krmených náhradní mléčnou výživou přidáván inulin, podobá se jejich mikroflóra složení střevní flóry kojenců. V období, kdy je u dítěte ukončeno kojení a započato podávání smíšené stravy, dochází k největším změnám. Mikroflóra trávicího traktu dítěte se začíná výrazně měnit v mikroflóru dospělého člověka (Mikroflóra lidského organismu, 2018; Zbořil, 2005; Adamcová, 2010).

2.2 Genetická informace mikroorganismů

Bakterie jakožto prokaryotní organismus nemá buněčné jádro. Genetická informace je uložena v chromozomu nebo extrachromozomálním genomu. Chromozom je tvořen kruhovitě uzavřenou dvoušroubovicí DNA sbalenou do klubka. Bakterie jsou haploidními organismy, neboť mají v buňce jeden chromozom. Je upevněný k membráně buňky. Proteiny a kruhovitý chromozom tvoří nukleoid. Bakteriální geny jsou obvykle v jedné kopii. Výjimku tvoří geny pro rRNA kódující tvorbu ribozomů (Otová, 2012; Bednář, 1999).

Další genetická informace bakterií je uložena v cytoplazmatických organelách nazývaných plazmidy. Jedná se o kruhovitou molekulu DNA, která je menší velikosti než chromozom. Plazmidy jsou uloženy uvnitř buněk v několika kopiích a jsou schopny nezávislé replikace na chromozomu. Genetická informace uložená v plazmidech je variabilní a zvyhodňuje příslušnou bakterii. Může se jednat například o rezistenci k antibiotikům, produkci toxinů či syntézu adhezínů. Konjugací nebo transformací se mohou například geny pro rezistenci přenášet mezi jednotlivými bakteriemi (Otová, 2012; Schindler, 2014).

2.3 Kožní mikrobiom melanomů a melanocytárních névů

Mikrobiální flóra kůže se na různých částech těla liší a pro každou oblast je typická jiná skupina mikroorganismů. Některá kožní onemocnění, jako například atopický ekzém, jsou spojována se změnami kožního mikrobiomu. Objasnění mikrobiálních diverzit při onemocněních by mohlo vést k novým způsobům diagnostiky a léčby. Spojování mikroflóry a rakoviny kůže je prozatím hypotézou (Salava, 2016).

V dostupných zdrojích je popsána studie zabývající se diverzitou mikrobiální flóry kůže u melanomu. K výzkumu bylo odebráno 15 kožních melanomů a 17 benigních melanocytárních névů. Cílem výzkumu bylo ověření, zda se mikroflóra zdravé kůže liší od mikroflóry melanomu. Bylo zjištěno, že 95 % taxonomických skupin patřilo do kmenů *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* a *Bacteroidetes*. Nejintenzivnější osídlení bylo rodem *Propionibacterium*, následoval *Staphylococcus* a *Corynebacterium*. Statistickým zpracováním dat nebyly nalezeny významné odchylky mezi bakteriální flórou jednotlivých vzorků. Vzorky melanomu měly okrajově rozdílnou mikrobiální diverzitu. Získaná data tedy naznačují, že kožní mikrobiom nemusí být vhodným nástrojem k diagnostice melanomu a benigních melanocytárních névů (Salava, 2016).

2.4 Melanom

Vznik melanomu je způsoben maligní transformací melanocytů. Není způsoben mutací jediného genu, ale souborem většího počtu změn v genomu těchto buněk. Největší zastoupení tvoří melanomy vzniklé z epidermálních melanocytů. Přibližně 4 % jsou melanomy z uveálních melanocytů a primárních melanocytů CNS (Krajsová, 2017).

K rizikovým faktorům vzniku tohoto onemocnění patří genetické dispozice, velké kongenitální névy, léková imunosuprese, například u nemocných HIV a v neposlední řadě UV záření (Šťastnová, 2007).

Maligní melanomy se řadí k nejčastějším zhoubným nádorům. Tvoří polovinu všech zhoubných onemocnění. Pouze 4 % kožních nádorů jsou maligních, přesto se jedná o častou příčinu úmrtí (Adam, 2003).

Melanom se vyskytuje především u lidí bílé rasy s méně pigmentovanou kůží. Nejčastěji se onemocnění vyskytuje v Austrálii, Novém Zélandu, ale i ve státech severní Evropy,

především u světlolasých obyvatel. Česká republika se řadí do zemí se střední incidencí nemoci (Vorlíček, 2012).

2.4.1 Kožní melanomy

První z typů kožního melanomu vzniká nejčastěji na místech, která nejsou slunečnímu záření trvale vystavována. Jedná se především o trup a proximální části končetin. Do této skupiny patří plošně se šířící melanom, melanom s vertikálním růstem, primárně nodulární melanom a sekundárně nodulární, plošně se šířící melanom (Krajsová, 2017).

Druhým typem kožních melanomů jsou melanomy vznikající v důsledku chronického solárního poškození. Objevují se na chronicky vystavovaných oblastech kůže jako je hlava, krk či distální části končetin (Krajsová, 2017).

Posledním typem kožního melanomu je akrolentiginózní melanom, charakterizovaný zvýšenou genetickou instabilitou. Vyskytuje se na ploskách nohou, dlaních a subunguální oblasti. U černochoů představuje až 75 % všech melanomů (Krajsová, 2017; Krška, 2014).

2.4.2 Slizniční melanomy

Slizniční melanomy vykazují taktéž genetickou nestabilitu. Jejich výskyt je velmi vzácný. Vznikají například ve vedlejších dutinách nosních, či na sliznici ústní dutiny, zevních rodidel a močového měchýře (Krajsová, 2017; Krška, 2014).

2.4.3 Uveální melanomy

Tento typ melanomu vzniká z melanocytů cévnatky, duhovky nebo řasnatého tělíska. Střední vrstva oční koule neobsahuje lymfatické cévy, a proto se uveální melanomy šíří hematogenní cestou, preferenčně do jater (Krajsová, 2017).

2.4.4 Primární melanomy CNS

Vzácný typ melanomu vznikající z melanocytů měkkých plen mozku. Diagnóza se určuje poté, co je vyloučena metastáze v jiných oblastech (Krajsová, 2017).

2.4.5 Melanocyty

Melanocyty jsou buňky neuroektodermálního původu nacházející se především v kůži a bazální vrstvě epidermis. Melanoblasty, nezralé prekuzory melanocytů, opouštějí v prvním trimestru embryogeneze neurální lištu a osidlují nejprve tkáň, na závěr pak epidermis. V tomto místě se ukládají a diferencují do vyzrálých dendritických melanocytů. Kromě epidermis jsou melanocyty uloženy také v koriu v okolí mazových žláz, ve vlasových folikulech a okolí prsních bradavek (Krajsová, 2017; Krajsová, 2008).

Procesem melanogeneze vytváří všechny melanocyty tmavý pigment, melanin. Ten slouží jako ochranný mechanismus kůže před škodlivými účinky UV záření. V epidermis jsou kromě melanocytů uloženy keratinocyty v poměru od 1 : 4 až 1 : 15. Melanin shromažďovaný v melanozomech se dostává pomocí melanocytů do keratinocytů, kterých má k sobě takto vázaných asi 30. Pouze kožní melanocyty mají schopnost předávání melaninu do dalších buněk. Barva kůže nezávisí na počtu melanocytů, ale na odlišné produkci melaninu a následném transportu do epidermis (Pizinger, 2003).

Pokud melanocyt změní své vlastnosti a charakteristiky, nazýváme jej atypickým melanocytem. Stejně jako nezměněný melanocyt tvoří benigní névy (atypické névy), které mají ale vyšší riziko vzniku melanomu. Jestliže v atypickém melanocyту dojde k dalším genetickým nebo epigenetickým změnám, melanocyt nabývá charakteru maligních buněk a vzniká melanom, který se může objevit jednak v existujících benigních pigmentových lézích, častěji však vzniká na zdravé nepostižené kůži (Krajsová, 2008).

2.4.6 Vznik névu

Za normálních okolností se melanocyty nacházejí v kůži samostatně. Pokud se začnou množit a následně i hromadit, mohou se vytvořit buněčná hnízda podél bazální membrány a vzniká tzv. benigní melanocytární junkční névus. Jestliže melanocyty v další vývojové fázi proniknou hlouběji do koría, budou vytvářet intradermální névy. Takovéto útvary se vyskytují u některých jedinců už od narození nebo těsně po něm a nazýváme je kongenitálními névy. Podle velikosti se dělí do tří skupin. U kongenitálního névu do 2 cm je riziko maligního zvratu malé, u névu většího než 20 cm je výskyt melanomu častější. Získané melanocytární névy patří do druhé skupiny. Vyskytují se mezi 12. a 30. rokem, v pozdějším věku névy vymizí (Krajsová, 2008; Měšťák, 2015).

2.4.7 Charakteristika primárního kožního melanomu

Maligní melanom je obtížně léčitelný nádor, který je v 75 % příčinou úmrtí na rakovinu kůže. Včasná diagnostika maligního melanomu je předpokladem pro úspěšnou léčbu. Melanom, který metastazuje do orgánů těla je v podstatě nevléčitelný (Hejduková, 2014).

Tvar léze

Tvar kožního útvaru pomáhá při odlišení maligního melanomu a benigního melanocytárního névu. Kožní melanom se vyznačuje asymetrickým tvarem na rozdíl od benigního névu pravidelného tvaru (Krajsová, 2008).

Okraje a ohraničení léze

Okraje melanomu bývají nepravidelně ohraničeny. Nepravidelnost ohraničení roste úměrně s dobou vývoje nádoru (Krajsová, 2008).

Pigmentace

Zbarvení kožní léze napomáhá k prvotnímu odlišení benigního a maligního útvaru. Benigní pigmentové névy jsou obvykle hnědé. U melanomu lze odlišit různě intenzivní hnědou barvu, která v místě prorůstání do větší hloubky získává tmavě modrý až černý odstín. V místech regrese nádoru mají léze namodralou barvu, při úplné regresi je kůže v tomto místě bílá. Právě červeně nebo šedě zbarvená ložiska jsou více nebezpečná. Melanocyty takového útvaru již nejsou schopny tvořit pigment (Krajsová, 2008; Hejduková, 2014).

Velikost

Pokud je velikost léze v rozmezí 5–6 mm, většinou se nejedná o melanom. V případě, že by byla prokázána malignita, tak jde o časnou formu nádoru a prognóza je v tomto případě velmi pozitivní. Při klinickém vyšetření nádoru by měl alespoň jeden rozměr překračovat 6 mm (Krajsová, 2008).

Povrch

V okamžiku, kdy se na povrchu nádoru objevují šupiny, krusty, mokvání a krvácení, jedná se o pokročilé stádium a prognóza není příliš pozitivní (Krajsová, 2008).

Vertikální růst

Pokud je melanom rozpoznán v počátku, nalezneme jej obvykle v plošné fázi. Růst melanomu je individuální, ale v pozdější fázi začne růst vertikálně. Ložisko se může vyvyšovat lokálně nebo v izolovaných partiích. U melanomu v pokročilém stádiu dochází ke vzniku nádorových uzlů (Krajsová, 2008).

2.4.8 Diagnostické metody vyšetření melanomu u lidí

Vyšetření začíná pacientovou anamnézou, vysoce rizikovým pacientům je nabídnuto genetické poradenství. Nejstarší metoda používaná k diagnostice melanomu se nazývá ABCDE (asymetry – asymetrie, border – okraje, color – barva, diameter – velikost, elevation – elevace). Z histopatologického hlediska se hodnotí u melanomu tloušťka nádoru dle Breslowa a hloubka invaze dle Clarka. U pokročilého stádia se objevují zánětlivé okraje, krvácení či svědění. Upřednostňuje se vyšetření celého těla včetně míst, která nejsou pravidelně vystavována slunci, neboť i zde se často melanomy vyskytují. Za nejrizikovější oblasti těla se považují záda, paže, krk a hlava (Šťastnová, 2007; Adam, 2003; Krška, 2014).

Léze se vyšetřují tzv. dermatoskopem, který umožňuje až dvacetinásobné zvětšení a útvar je možné podrobněji vyšetřit. Při diagnostice melanomu se využívá imunohistochemické barvení a histologické vyšetření. Kvůli zvýšenému riziku tvorby metastáz není u léze maligního typu doporučována biopsie. Terapie začíná chirurgickým odstraněním tumoru a v pokročilých stádiích pokračuje léčba užíváním interferonu alfa, který má částečné protinádorové účinky a pravděpodobně stimuluje protinádorovou imunitní odpověď. Chemoterapie je určena pro pacienty s metastázami, které se nejčastěji objevují v kostech, plicích a játrech (Šťastnová, 2007; Hejduková, 2014).

2.5 Modelový organismus pro výzkum

K experimentálním účelům se chovají zvířata, u nichž jsou známé genetické i fyziologické vlastnosti. U všech generací je v rámci laboratorního chovu zajištěná standardizovaná strava a prostředí. Zvířata jsou posuzována z genetického a mikrobiálního hlediska. Genotypová a fenotypová variabilita je ovlivněna reprodukcí jedinců. První skupina jsou inbrední, geneticky totožná zvířata. Jedinci outbredních kmenů jsou naopak geneticky unikátní. Nejčastěji užívaným laboratorním modelem jsou myš a potkan.

Pro další specifické pokusy týkající se například respiračního systému nebo neurofyziologických problémů se používají i větší obratlovci jako kočka či opice (Sobotka, 2012).

Pro naši výzkumnou činnost se jevil optimální model miniprasat MeLiM, který byl vyšlechtěn z prasete domácího. Domestikace divokého prasete sahá do mladší doby kamenné. Prvním státem, kde se prase chovalo pro laboratorní účely, byly Spojené státy americké na konci 40. let 20. století. V první řadě se šlechtitelé snažili minimalizovat hmotnost prasete. Miniprasata jsou méně náročná na ustájení a spotřebu potravy. V porovnání s jatečnými prasaty má miniprase méně podkožního tuku. Pohlavní dospělost nastává u miniprasat mezi 4. a 5. měsícem života (Jebavý, 2011).

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově chová MeLiM model miniprasat s dědičnou formou spontánně regredujícího maligního melanomu. Melanomy těchto miniprasat jsou svými vlastnostmi velmi podobné lidským maligním melanomům a z toho důvodu jsou vhodné jako model pro vědecká zkoumání. Dále jsou miniprasata v Liběchově využívána při výzkumu Huntingtonovy choroby, neboť mají ve své genetické informaci inzertován mutovaný lidský gen kódující protein huntingtin, který je spojený se vznikem tohoto neurodegenerativního onemocnění (Olivová, 2016; Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017).



Obrázek 1: Liběchovské miniprase MeLiM (Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017)

2.6 Molekulární metody studia mikroorganismů

2.6.1 Metody izolace DNA

K získání čisté a nativní nukleové kyseliny z biologického materiálu vede několik metod, z nichž každá využívá jiné vlastnosti. Jedná se o rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpci na pevný poklad nebo ultracentrifugaci v gradientních roztocích. Pouze výběr správné metody a zachování postupu vede k výtěžku kvalitního materiálu pro další zpracování (Šmarda, 2005).

Při izolaci DNA je nezbytné zachovat standardní operační postupy, které vedou k získání kvalitní, neznečištěné a nefragmentované DNA. Zpracování materiálu po nesprávně provedené izolaci by mohlo vést k falešným výsledkům a ohrožení pacienta. Pokud bude ale izolace provedena správně, získáme DNA, která je velmi stabilní molekulou a za vhodných podmínek může být skladována řadu let (Zvárová, 2012).

Základním rysem purifikace nukleových kyselin je dostupnost vstupního materiálu a jejich oddělení od růstových médií (u bakteriálních kultur) nebo homogenizace tkání a pletiv. Nejvhodnější ke zpracování je materiál čerstvý, zamražený nebo lyofilizovaný, aby nedocházelo k degradaci nukleových kyselin (Šmarda, 2005).

Výběr vhodného lyzačního činidla závisí na typu buňky. K rozrušení bakteriální stěny se využívá enzym lysozym společně s detergenty pro solubilizaci cytoplazmatické membrány a EDTA, jakožto chelatační činidlo vyvazující dvojmocné kationty vápníku, čímž inhibuje deoxyribonukleázy a destabilizuje vnější bakteriální stěnu. K lýze buněk rostlin a hub se využívá enzym celulóza. Pro rozrušení živočišných buněk postačí slabé neiontové detergenty. Nejčastěji používaným detergentem je Triton X-100 nebo dodecylsulfát sodný. Při izolaci DNA z tkání je nezbytné před použitím detergentu tkáň homogenizovat (Kočárek, 2007).

Zahřátím na 65 °C se vzorek zbaví nežádoucích deoxyribonukleáz, které by mohly poškodit DNA. Tato teplota ovšem neomezuje účinnost teplotě stabilních ribonukleáz, které ze vzorku odstraňují RNA (Šmarda, 2005).

Extrakce proteinázou K

Proteináza K je enzym štěpící bílkoviny. Používá se tehdy, pokud je nezbytné izolovat velmi čistou DNA. Obvykle je součástí extrakčního pufru, který se přidává k izolovanému materiálu. Směs se inkubuje při 37 °C (popř. 57 °C). U pojivových tkání se používají enzymy elastáza nebo kolagenáza (Kočárek, 2007).

Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin

Pro zvýšení účinnosti experimentu je nezbytné odstranit proteiny, které by se mohly navázat na DNA a ovlivnily by takto výsledek. Proteázy lze nahradit směsí fenolu a chloroformu nebo pufrem ekvilibrovaným fenolem. Po přidání zmíněných organických látek do vodného prostředí buněčného lyzátu vznikají dvě vrstvy. Důkladným promícháním dochází k denaturaci proteinu. Vysrážené proteiny lze oddělit centrifugací. V případě, že byl použit fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo zásaditým pufrem, nukleové kyseliny zůstaly ve vodné fázi. Oddělit nukleové kyseliny do dvou fází lze za předpokladu, že bude při extrakci použit kyselý fenol. Ve vodné fázi zůstává RNA a DNA přechází do organické fáze. K přečištění nukleové kyseliny od fenolu a chloroformu slouží precipitace alkoholem. Přítomnost jednomocných iontů (Na^+ , K^+) nukleovou kyselinu vysráží do podoby agregátu, který sedimentuje při centrifugaci na dno zkumavky. Přidáním solí (2M NaCl) a snížením teploty na -70 °C lze účinnost srážení zvýšit. Soli se mohou částečně s nukleovými kyselinami srazit a je nezbytné, aby se poté z precipitátu odstranily promytím 70% etanolem. Vzorek se nechá následně stát, aby došlo k odpaření etanolových par. K DNA se přidá vodný roztok pufru TRIS-HCl (pH 7,5–8,0) a inhibitor nukleáz EDTA (Šmarda, 2005).

Adsorpce na silikát

K buněčnému obsahu se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic – DNA v její přítomnosti adhezuje na silikátový povrch. Protřepáním ulpívají molekuly DNA na částicích a ostatní látky se usazují. Roztok nad částicemi se odsaje a zbylý obsah je propláchnut novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Obsah zkumavky se opět odstředí, odsaje se roztok a na částicích zůstává adherovaná čistá DNA. Přidáním vody nebo pufru se DNA z částic snadno uvolní. Po odstředění zůstanou částice na dně zkumavky a nad nimi čistý roztok DNA.

Magnetické částice

K izolaci DNA se využívají také magnetické částice kulovitého tvaru. Jejich velikost se pohybuje od 5 nm do 100 μm . Izolace nukleové kyseliny začíná jejím navázáním na optimálně modifikovaný povrch částice. Zkumavka je poté přiložena k magnetu. Vzhledem k tomu, že je jádro tvořeno z magnetitu (popř. maghemitu), částice s navázanou nukleovou kyselinou se přes stěnu zkumavky přilnou k magnetu. Přebytečná kapalina je odstraněna a zkumavka je opakovaně promývána. Nakonec je přidána látka, která uvolní nukleovou kyselinu z částic do roztoku (Janochová, 2009).

2.6.2 Stanovení koncentrace a kvality DNA

U některých laboratorních metod je nezbytné připravit roztok DNA o přesné koncentraci. K jejímu stanovení se používají dvě metody – fluorometrická metoda a častěji užívaná spektrofotometrická metoda. Využívá se schopnosti nukleové kyseliny absorbovat záření o vlnové délce 260 nm. Absorbance odpovídá koncentraci nukleových kyselin. Absorbance rovna 1,0 odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Spektrofotometrickou metodou se dá změřit nejen koncentrace, ale i čistota. DNA je nejčastěji kontaminovaná fenolem, nebo bílkovinami, které absorbují záření o vlnové délce 280 nm. Pokud je poměr absorbancí při 260 a 280 nm nižší než 1,75, doporučuje se opakovat purifikaci. Optimální hodnoty absorbance čisté DNA je 1,8–2,0 (Kočárek, 2007; Brown, 2007).

Některé laboratoře využívají ke kontrole čistoty DNA poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 230 nm. Při 260 nm absorbují nukleové kyseliny, při 230 nm nízkomolekulární látky jako fenol, EDTA či polysacharidy. Optimální hodnota poměru absorbancí by u čisté nukleové kyseliny měla přesáhnout 2,0 (Janochová, 2009).

2.6.3 Amplifikace DNA

Metoda PCR zavedená v roce 1985 Kary B. Mullisem byla velkým přínosem do oboru molekulární biologie. Principem PCR je cyklicky se opakující amplifikace vybraného úseku DNA, který se označí pomocí dvou primerů. Syntéza nových úseků probíhá ve směru 5' \rightarrow 3' za přítomnosti termostabilních DNA polymeráz získaných z bakterií žijících v prostředí horkých pramenů. Nejznámějšími jsou *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Pyrococcus furiosus* a *Thermococcus litoralis*. Výběr vhodné DNA polymerázy zohledňuje některé její vlastnosti, jako například životnost při vysokých

teplotách, přesnost či rychlost elongace. Nejčastěji používaná DNA polymeráza je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Primery jsou krátké oligonukleotidy DNA komplementární k začátku a konci amplifikovaného úseku (genu). V rámci této práce byl primery označen gen pro 16S ribozomální RNA. V okamžiku, kdy se přidá DNA polymeráza s nukleotidy, začne probíhat protisměrně na obou matricových řetězcích syntéza nových vláken (Šmarda, 2005; Dvořáková, 2007).

Při PCR se cyklicky opakují tři kroky, během nichž probíhají v závislosti na teplotě rozdílné děje.

- 94–97 °C – v prvním kroku dvouřetězcová molekula DNA denaturuje. Proces počáteční denaturace trvá 2–5 minut. Denaturace amplikonů trvá 15–45 vteřin.
- 30–65 °C – na řetězce DNA nasedají primery. Doba pro navázání primerů se pohybuje od 30 do 60 vteřin.
- 65–75 °C – DNA polymeráza syntetizuje nové řetězce DNA rychlostí cca 60 bází/vteřinu. Tento krok trvá 45 vteřin až 2 minuty.

Přístroj, v němž jsou automaticky nastaveny teploty a časové intervaly jednotlivých kroků, se nazývá termocykler. Metodu PCR lze označit jako způsob klonování DNA, neboť při opakování cyklů roste exponenciálně počet kopií vybraného úseku. Optimální počet cyklů je 25 až 30, při vyšším počtu se zvyšuje množství nespecifických produktů PCR (Šmarda, 2005).

Reakční směs je tvořena DNA polymerázou, primery, hořčnatými ionty Mg^{2+} tvořícími rozpustný komplex s nukleotidy rozpoznávanými DNA polymerázou (Šmarda, 2005).

2.6.3.1 Nejčastěji používané modifikace PCR v mikrobiologii

Kvantitativní PCR (qPCR)

Real-time PCR je kvantitativní verze metody PCR. Rozdíl od konvenční PCR je v detekci fluorescence během amplifikace produktu. K vizualizaci amplifikace DNA se používají specifické a nespecifické chemické látky. Mezi skupiny nespecifických chemických látek patří tzv. interkalační barvy. Reverzibilně se vážou do žlábků dvouvláknové DNA a způsobují fluorescenci, která je detekovaná PCR fluorimetrem. S přírůstkem PCR produktu roste fluorescence vzorku. Nevýhodou nespecifických barviv

je, že se vmezeří také do dvoušroubovice nspecifických produktů a výsledek qPCR je zkreslen. Nejčastěji užívanými barvivy je SYBR Green, SYBR Gold, Fluorescein a ethidiumbromid. Využívání sondy k detekci amplifikace DNA se řadí do druhé skupiny specifických chemických látek. Každá sekvence úseku DNA vyžaduje vlastní sondu, díky čemuž lze během jedné qPCR reakce detekovat amplifikaci více rozdílných sekvencí najednou. Výroba specifických sond je finančně nákladná (Dvořáková, 2007; Inglis, 2012).

Hybridizační sondy jsou krátké oligonukleotidy, které se specificky vážou na amplifikovaný úsek DNA. Používají se Hydrolyzační sondy TaqManTM nebo Scorpions[®] (Lysková, 2008).

Primery i hybridizační sondy jsou označovány fluorofory, které po absorpci světla emitují světlo vyšší vlnové délky. Některé sondy mají dvojité značení, kdy obsahují navíc zhášec, který přijatou energii z fluoroforu rozptýlí ve formě světla nebo tepla (Šmarda, 2005).

Reverzně transkripční PCR (RT-PCR)

Zpětná PCR využívá retrovirové zpětné transkriptázy k převedení izolované molekuly RNA do cDNA. Amplifikace probíhá standardním postupem (Lysková, 2008).

PCR amplifikace a předcházející převod RNA do cDNA mohou probíhat jako one-step RT-PCR v jedné zkumavce, nebo odděleně v tzv. two-step RT-PCR. Při one-step RT-PCR se využívá DNA polymeráza izolovaná z *Thermus thermophilus* k převedení RNA na cDNA a po nasednutí dvou primerů stejná polymeráza syntetizuje druhé vlákno (Růžičková, 2012).

V klinické praxi se metoda využívá při analýze genové exprese, podezření na geneticky podmíněnou nemoc, u které jsou zaznamenány změny v sekvenci mRNA a poslední vyšetření je u nemocí, jejichž původci jsou RNA-viry (Kočárek, 2007).

2.6.4 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Elektroforéza využívá schopnosti pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Fragmenty DNA jsou rozděleny podle náboje a molekulové hmotnosti. Fosfátové skupiny nukleových kyselin způsobují celkový záporný náboj molekuly, a proto se v elektrickém

poli pohybují ke kladné elektrodě – anodě. Elektroforézou lze oddělit nejen nukleové kyseliny, ale i proteiny (Kočárek, 2007; Šmarda, 2005).

2.6.4.1 Gelová elektroforéza

Nosičem u tohoto typu elektroforézy je gel. Jedná se o polyakrylamidové nebo agarózové gely vytvářející síťovitou strukturu s póry. Změnou složení nebo koncentrací polymeru lze ovlivnit velikost těchto pórů a tím docílit optimálních vlastností nosiče pro separaci molekul. Gelová elektroforéza se rozlišuje podle polohy gelu na horizontální a vertikální. Kapilární elektroforéza má gel uvnitř kapiláry (Šmarda, 2005).

Agarózový gel se připravuje z polysacharidu agarózy získaného z mořských řas. Zahřátím se rozpouští v pufru a nalévá do forem, kde tuhne v gel. Agarózová elektroforéza se používá pro separaci molekul nukleových kyselin od 100 bp do 50 kb. K rozdělení fragmentů o délce 200 bp se používá 4% gel. S rostoucí velikostí úseků se snižuje koncentrace gelu. Pro menší molekuly od 10 do 100 bp se využívají polyakrylamidové gely, které jsou připravovány z akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu. Molekulární síto je velmi husté a umožňuje rozdělit úseky lišící se jedním párem bází. Roztok k výrobě polyakrylamidového gelu se lije mezi dvě skla, aby polymerace proběhla bez přístupu vzduchu (Šmarda, 2005; Kočárek, 2007).

Náboj na molekule nukleové kyseliny je rovnoměrně rozprostřen. Pro rychlost pohybu v gelu, označovanou jako elektroforetická pohyblivost, se nezohledňuje velikost náboje, ale velikost molekuly. Zde platí, že čím jsou fragmenty DNA menší, tím rychleji se pohybují. Menší úseky DNA budou tedy blíže k anodě. Při identifikaci vzorků neznámé velikosti se výsledek elektroforézy porovnává se standardy velikosti nebo hmotnostními standardy, u nichž byla velikost zjištěna již dříve sekvenováním DNA (Šmarda, 2005; Kočárek, 2007).

Ke správnému vyhodnocení gelové elektroforézy je nezbytné přesně určit polohy separovaných molekul. Toto zhodnocení není možné provést pouhým okem. Pro vizualizaci DNA se používá interkalační barvivo ethidiumbromid, které se dostává mezi sousední páry bází. Vzniká komplex, který po osvětlení UV zářením červeně fluoreskuje. K obarvení lze použít také barvivo komerčně značené SYBR Green nebo GelRed. U polyakrylamidových gelů lze DNA vizualizovat stříbrem. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci DNA.

Polohu fragmentů DNA lze detekovat hybridizací se značenou sondou. Vizualizace DNA je možná transiluminátorem, který gel prosvítí UV světlem (Šmarda, 2005).

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Denaturační gradientová gelová elektroforéza byla poprvé aplikována na výzkumu mikrobiálních skupin v roce 1993. Primárně se pro identifikaci bakterií touto metodou využívá 16S rRNA gen, ale používají se také geny *cpn60* a *rpoB* (Inglis, 2012).

Denaturační gradientová gelová elektroforéza využívá rozdílnou elektroforetickou mobilitu. Dokáže detekovat odchylky v sekvenci (bodové mutace) v krátkých molekulách částečně denaturované i nedenaturované DNA. Denaturační gradientové gelové elektroforéze předchází stejně jako u ostatních typů elektroforéz PCR, při níž jsou fragmenty DNA amplifikovány. Vzorky se následně aplikují do polyakrylamidového gelu. Podstatnou vlastností gelu je lineární denaturační gradient, který může být zajištěný vzrůstající koncentrací denaturačního činidla nebo vzrůstající teplotou. Během elektroforézy dvouřetězcová DNA denaturuje, čímž se vytváří větvená struktura s jednořetězcovými oblastmi. Rychlost denaturace je závislá na její sekvenci (GC páry drží pevněji než AT páry). Stejně dlouhé molekuly dvouřetězcové DNA obsahující sekvenční polymorfismus vytváří odlišné struktury s rozdílnou elektroforetickou mobilitou. Na konce analyzovaných fragmentů se připojí GC svorky, díky nimž nedojde k úplné denaturaci, při které by výsledkem byly jednořetězcové formy. Při zajištění kvalitního gradientního gelu umožňuje DGGE specificky separovat směs molekul lišící se jedinou bází (Šmarda, 2005).

2.6.5 Sekvenování nukleových kyselin

Sekvenování nukleových kyselin je metoda, při které dokážeme přesně určit pořadí nukleotidů v řetězci. Sekvenování se využívá u řady dalších biopolymerů, například proteinů, kde určíme pořadí jednotlivých aminokyselin (Zvárová, 2012).

Historie sekvenování sahá do roku 1973, kdy Frederik Sanger s kolegy ve Velké Británii popsal metodu, která se pozdějšími modifikacemi stala základem pro tzv. „plus-minus“ metodu, která primárně sloužila ke čtení genomu bakteriofágu phiX174. V roce 1977 popsal nový postup, při němž bylo opět vlákno syntetizováno DNA polymerázou a báze byly radioaktivně značeny. Rozdíl byl ale v principu detekce pořadí bází. V nové metodě docházelo k zastavení polymerace v místě zvolené báze. O dva roky později publikovali

Allan Maxam a Walter Gilbert metodu sekvenování založenou na chemické degradaci. V době svého objevení byly obě metody populární. V současné době se upřednostňuje Sangerova metoda před Maxam-Gilbertovou metodou, při které se používají toxické chemikálie. Výhodou Sangerovy metody je také možnost automatizace (Zvárová, 2012; Brown, 2007).

Sangerovo enzymatické sekvenování

Tento typ sekvenování patří do skupiny metod označované jako sekvenace syntézou. K templátovému vláknu je syntetizováno komplementární vlákno tak, jak k tomu dochází *in vivo* (Zvárová, 2012).

Sekvenování metodou podle Frederika Sangera je modifikací klasické PCR. Směs pro tuto metodu tvoří DNA, primer, DNA polymeráza a stavební jednotky, kterými jsou nukleotidy (dNTP) a fluorescenčně značené modifikované dideoxynukleotidy (ddNTP), které nemají OH skupinu na druhém, ale ani na třetím uhlíku, na kterou by se mohl navázat další nukleotid. Syntetizování DNA probíhá ve směru od primeru, kde PCR polymeráza podle komplementarity templátového vlákna postupně přidává stavební jednotky. Pokud jsou součástí nového vlákna klasické nukleotidy, syntéza pokračuje dál. V okamžiku, kdy je do syntézy zapojen modifikovaný nukleotid, je reakce zastavena.

K zastavení reakce dochází náhodně na různých pozicích molekul, díky čemuž vznikají dvouvláknové řetězce lišící se svou délkou. Každý z produktů je zakončen modifikovaným dideoxynukleotidem, který byl dříve značen radioaktivně. Dnes se k označení používají fluorescenční značky čtyř různých barev (Zvárová, 2012).

Výsledkem čtyř reakcí, z nichž každá probíhá s odlišným dideoxynukleotidem, jsou čtyři směsi, ve kterých jsou polynukleotidy zakončené vždy jedním typem dideoxynukleotidu. Následuje separace v gelové elektroforéze, kdy je detekována fluorescence z délky a signálu (každý z nukleotidů má jinou značku). Používají se polyakrylamidové gely s močovinou (Brown, 2007).

Maxam-Gilbertova metoda chemického sekvenování

Maxam-Gilbertova metoda se využívá k sekvenování DNA, u které se vytváří smyčky. Ty by mohly u Sangerovy metody bránit v postupu DNA polymerázy. V běžné praxi se jedná spíše o alternativní metodu (Brown, 2007).

Vzorek je nejprve označen fosfátovou skupinou a poté zahřát na 90 °C. Dochází k denuraci a rozpletení na dvě vlákna rozdělená gelovou elektroforézou na základě množství purinových bází. Vlákno je přečištěno a ve čtyřech odlišných zkumavkách se nechá reagovat s jednou z chemikálií. Rozdíl oproti enzymové metodě spočívá v tom, že zde dochází ke štěpení analyzovaného úseku DNA namísto syntézy komplementárního vlákna k templátovému. Použitá chemická činidla jsou specifická pro určitou bázi, kterou z řetězce uvolní a v takto oslabeném místě dojde k štěpení. Nevýhodou této metody je použití radioaktivního fosforu ke značení fragmentů DNA (Zvárová, 2012; Brown, 2007).

Sekvenování nové generace (NGS)

U sekvenování podle Sangera je nutné oddělit geny pocházející z různých bakterií, protože výsledné signály by se překrývaly a nebylo by možné určit, které z bakterií nukleotid patří. Sekvenování nové generace tuto selekci nevyžaduje a je schopno paralelně sekvenovat až tisíce různých sekvencí současně. V současné době je na trhu několik NGS technologií, které se liší sekvenační kapacitou, rychlostí, délkou čtení, kvalitou sekvencí, cenou přístrojů a reagensů. Nicméně všechny technologie vycházejí z obecného postupu. Prvním krokem sekvenování je fragmentace DNA. Úseky dlouhé řádově několik set bází jsou enzymaticky označeny na koncích adaptéry. Fragmenty DNA jsou pomocí PCR amplifikovány a následně sekvenovány. Výstupem je velké množství dat, které je dále analyzováno. Nejužívanějšími platformami NGS jsou technologie 454 od firmy Roche, Solexa od firmy Illumina a Iont Torrent od firmy Life Technologies (Sekvenování nové generace, 2014).

Genové čipy

Genové čipy se využívají například k detekci mutací, změn genové exprese nebo sekvenování. Principem metody je hybridizace několika desítek až tisíců sond s vyšetřovanou nukleovou kyselinou. Podle přítomnosti, nepřítomnosti a intenzity signálu lze určit patologické stavy jako mutace či amplifikace genů. Sondy jsou nanoseny na

speciálním skle nebo membráně a chemickými nebo fyzikálními procesy jsou na povrchu pevně uchyceny. Chemická látka na povrchu skleněného biočipu vytváří s nukleovými kyselinami pevnou kovalentní vazbu. U membránových biočipů se provádí fixace působením UV záření. Hybridizační signál je zaznamenáván skenerem nebo kamerou a vyhodnocen počítačovým programem. Kromě fluorescenčních barviv se ke značení používají radioaktivní značky. U aktivních biočipů jsou sondy spojeny se zdrojem napětí. Při navázání nukleové kyseliny na sondu se změní napětí, které je zaznamenáno měřicím aparátem. Výhodou aktivních biočipů je možnost uvolnit nukleovou kyselinu od sondy a čip znovu použít (Kočárek, 2007).

Technologie 454 (Roche)

Technologie využívající pyrosekvenování fragmentů připravených emulzní PCR. I u této metody platí, že začíná fragmentací DNA na úseky dlouhé 300–800 bp. K označení se používají dva typy adaptéru, jež by měly vždy ve dvojici fragment označit. Úseky s párem stejných adaptérů jsou odstraněny. Fragmenty jsou imobilizovány na kuličky. Ty jsou v následujícím kroku zapouzdřeny emulzním olejem. Každá kulička obsahuje prvky nezbytné k proběhnutí PCR reakce. Výhodou emulzní PCR je, že umožňuje amplifikaci dílčích fragmentů. Jednotlivé kuličky jsou po dokončení PCR vloženy do jamek destičky. Ke každé kuličce je přidána ATP sulfuryláza, luciferáza a DNA polymeráza, která syntetizuje DNA na všech molekulách vázaných na kuličku. Tento krok probíhá opakovaně, neboť se přidává vždy pouze jeden typ nukleotidu. Při navázání nukleotidu dochází ke vzniku ATP přeměňujícího luciferin na oxyluciferin. Výsledkem těchto enzymatických reakcí je luminiscence zachycovaná detektorem. Na závěr reakce je ze směsi přidáním apyrázy odstraněno ATP a přebytečné nukleotidy (454 (Roche), 2014).

3 CÍL PRÁCE

Cílem bylo seznámit se s technikami a metodami stanovení mikrobiálních diverzit těla člověka a laboratorních modelů.

Pomocí molekulárně-biologických metod analyzovat kožní a melanomovou tkáň miniprasat MeLiM, která jsou vhodným modelem k analýze kožní mikroflóry, neboť její složení je velmi podobné lidské.

Stanovit diverzitu mikrobiomu zdravé a melanomové tkáně, protože znalost zastoupení bakteriálních druhů by mohla přispět k efektivnější léčbě lidských melanomů.

4 METODIKA

4.1 Skupina analyzovaných zvířat

K výzkumu byl vybrán prasečí MeLiM (Melanoma Libechov Minipig) model. Vzorky byly odebrány z prasat ve věku 6., 8., 10. a 12. týdnů s progredující i regredující fází onemocnění. 10. týden stáří je považován za období, kdy se onemocnění začne vyvíjet regresivně či progresivně. Pro analýzu kožního mikrobiomu byly odebírány vzorky v 10. týdnu věku zvířat.

Pro analýzu mikrobiomu bylo vybráno 8 jedinců v regresivní fázi onemocnění a 4 jedinci v progresivní fázi. Kontrolní skupinou bylo 15 zdravých jedinců.

Miniprasatům určeným k výzkumu nebyla podávána žádná antibiotika či antiseptika, která by mohla ovlivnit složení kožního mikrobiomu.

4.2 Odběr biologického materiálu

Seškraby z melanomu a kůže byly prováděny ze stejných míst těla zvířete, aby se předešlo interferencím způsobenými diverzitami mikroflóry různých oblastí. Každé dva týdny byly prováděny odběry ze stejného melanomu a stejné vzdálenosti od melanomu.

Odběry probíhaly v Laboratoři biologie nádorů pod vedením Bc. RNDr. MUDr. Moniky Červinkové, Ph.D.

4.2.1 Seškraby z melanomu a kůže

Seškraby z melanomu a kůže byly provedeny z definované plochy o velikosti 4 cm² sterilní čepelí skalpelu. Seškraby kůže se prováděly 5 cm od okraje příslušného melanomu. Byly uchovávány ve zkumavce s enzymatickým lyzačním pufrem při -80 °C.

4.3 Izolace DNA

K izolaci DNA jsme použily DNeasy PowerBiofilm Kit od firmy QIAGEN určený k izolaci DNA z biofilmových vzorků. Postupovali jsme podle doporučeného návodu firmy dostupného na webových stránkách <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-powerbiofilm-kit/#orderinginformation>.

Veškerý biologický materiál získaný od konkrétního živočicha jsme použili k izolaci DNA. Do nové 2 ml zkumavky jsme vložili přibližně 0,2 g materiálu získaného seškrabem. Zkumavku jsme při $13\ 000 \times g$ pod dobu 1 minuty centrifugovali. Biologické vzorky se liší obsahem vlhkosti, která by mohla snížit výtěžek DNA. Z tohoto důvodu je nezbytné biologický materiál v prvním kroku centrifugovat. Přebytkovou kapalinu jsme odsáli pomocí pipety. Materiál, který zůstal na dně, jsme resuspendovali ve 350 μ l roztoku BF1 a přenesli do zkumavky, která obsahovala drobné kuličky sloužící k mechanické homogenizaci vzorku (Bead tube). Roztok BF1 obsahoval detergent, který způsobil degradaci buněčné stěny a přispěl ke stabilizaci DNA. V dalším kroku jsme přidali 100 μ l roztoku BF2, který taktéž napomáhal lýze buňky a zachování integrity DNA. Krátce jsme pomocí vortexu promíchali. Abychom zaktivovali lyzační komponenty, zkumavku jsme nechali inkubovat při 65 °C po dobu 5 minut.

K homogenizaci jsme použili přístroj FastPrep, do kterého jsme vložili zkumavku a 30 vteřin při 3 200 rpm obsah homogenizovali. Následně jsme při $13\ 000 \times g$ 1 minutu obsah centrifugovali. Veškerý supernatant jsme přenesli do nové 2 ml zkumavky. Tímto krokem se buněčné úlomky a další organické i anorganické látky usadily na dně zkumavky, zatímco DNA zůstala v supernatantu. Přesunem supernatantu do nové zkumavky jsme zajistili zvýšení výsledné čistoty DNA.

Do zkumavky jsme přidali 100 μ l roztoku BF3 a krátce promíchali. Inkubovali jsme 5 minut při 4 °C. Tento roztok byl činidlem, který zajistil odstranění látek, které neobsahovaly DNA. Jednalo se zejména o polysacharidy a bílkoviny. V následujícím kroku jsme zkumavku centrifugovali při $13\ 000 \times g$ 1 minutu. Zkumavku s peletou jsme odstranili a do nové zkumavky jsme přesunuli supernatant, ke kterému jsme přidali 900 μ l roztoku BF4. Na vortexu jsme směs krátce promíchali. Činidlo BF4 byl koncentrovaný solný roztok, který v tomto kroku zajistil vhodné prostředí pro následnou vazbu DNA na oxid křemičitý.

Odebrali jsme 650 μ l supernatantu a přenesli jsme jej do MB Spin kolony a opět centrifugovali při $13\,000 \times g$ 1 minutu. Stejný postup jsme dodrželi i u zpracování zbylého supernatantu. DNA se selektivně navázala na membránu uvnitř kolony.

Kolonu jsme přenesli do nové 2 ml zkumavky, přidali jsme 650 μ l roztoku BF5 a při $13\,000 \times g$ 1 minutu centrifugovali. Roztok BF5 byl na bázi alkoholu a použili jsme jej k pročištění DNA. Promýváním jsme odstranili zbytky solí a dalších kontaminujících látek, zatímco DNA zůstala navázaná na membráně kolony.

Kapalinu, která protekla kolonou jsme odstranili a přidali 650 μ l BF6 a opět jsme při $13\,000 \times g$ 1 minutu centrifugovali. Roztok BF6 zajistil úplné odstranění roztoku BF5. Kapalinu na dně jsme odstranili a nechali jsme zkumavku centrifugovat při $13\,000 \times g$ 2 minuty. Opakovanou centrifugací jsme odstranily zbytky roztoku BF6, jehož složky by mohly případně způsobit interference s řadou metod.

Kolonu jsme vložili do nové 2 ml zkumavky. Abychom zajistili efektivní uvolnění DNA z membrány, navlhčili jsme ji 100 μ l roztokem BF7. Na závěr jsme zkumavku při $13\,000 \times g$ 1 minutu centrifugovali. Odstranili jsme kolonu a uschovali DNA, která byla na dně zkumavky v elučním roztoku.

Celkem byla izolována DNA z 90 vzorků.

4.4 Amplifikace genu kódujícího 16S rRNA

Pro stanovení mikrobiálních diverzit bylo nezbytné získat dostatečné množství DNA přítomných mikroorganismů, ve které jsme pro analýzu vybrali gen kódující 16S ribozomální RNA, který tvoří menší podjednotku ribozomů prokaryot. Je dlouhý asi 1 500 bp a na základě úmluvy rozčleněn na deset konzervovaných oblastí, v rámci kterých se mikroorganismy příliš neliší a devět variabilních úseků, podle kterých je možné mikroorganismus identifikovat. My jsme si označili primery úsek V3, který patří mezi variabilní úseky (Inglis, 2012).

K označení variabilních úseků se používají tři typy primerů. První a druhý primer má svou jedinečnou sekvenci, třetí primer má sekvenci totožnou s prvním typem primeru, ale na svém 5' konci je navíc přidáno 40 nukleotidových GC sekvencí, které se označují jako

GC svorka. K amplifikaci vybraného úseku se používají kombinace prvního a druhého nebo druhého a třetího primeru, které korespondují s pozicemi 338 a 534 u *Escherichie coli*. Sekvence použitého forward primeru 338GC byla 5'-CGCCCGCCGCGCCCCG CGCCCGGCCCGCCGCCGCCGCCGCACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', sekvence reverse primeru RP534 byla 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (Muyzer, 1992).

Tabulka 2: Objemy reaktantů při PCR reakci

DNA templát	1 µl
F primer 10×338GC	1 µl
R primer 10×534RP	1 µl
PCR mix	15 µl
dH ₂ O	12 µl

Ve 200 µl mikrozkušavce byl smíchán DNA templát, forward primer, reverse primer, PCR mix a PCR voda o požadovaném objemu (Tabulka 2). Celkový objem byl 30 µl. Reakční směs jsme promíchali a vložili do termocykleru. Aby reakce proběhla podle očekávání, bylo nezbytné zkumavku v bloku utěsnit, zavřít víko a zašroubovat. Výhodou používaného termocykleru je vyhřívání víko, které zabraňuje kondenzaci par. V přístroji je předdefinovaný program PCR-DGGE, ve kterém jsou zvoleny délky a teploty dílčích kroků potřebných k úspěšnému provedení reakce.

Vzorky byly nejprve při teplotě 94 °C po dobu 5 minut denaturovány, následovalo 35 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C 30 vteřin, annealingu primerů při 58 °C 30 vteřin a elongace při 72 °C 30 vteřin. Finální prodlužování probíhalo při 72 °C po dobu 5 minut. Tento postup je modifikací teplotního programu uvedeného v publikaci Muyzera (Muyzer, 1992).

Posledním krokem přibližně 2 hodinové reakce bylo chlazení na 8 °C. V tomto okamžiku jsme přístroj vypnuli, aby chlazení neprobíhalo dále. Dlouhodobým chlazením se snižuje životnost přístroje.

Vzorky byly stabilní při pokojové teplotě, ale pro další zpracování jsme je uskladnili v mrazáku.

4.5 Agarózová elektroforéza

Kvalitu proběhnuté PCR reakce jsme zkontrolovali elektroforézou v agarózovém gelu. Rozpuštěním 1,5 g agarózy ve 100 ml 0,5× TBE pufru jsme získali 1,5% gel. Za stálého míchání jsme směs přivedli k varu a poté odstavili z vařiče. Po mírném ochlazení gelu jsme přidali 3 µl ethidiumbromidu a mírně promíchali. Když teplota agarózy dosáhla asi 50 °C, nalili jsme ji na misku 50 ml, vložili hřebínek a nechali ztuhnout.

Po vyjmutí hřebínku vznikly ve ztuhlém gelu jamky pro nanášení vzorku. Do první jamky jsme nanесли 5 µl standardu a do každé následující 2 µl vzorku. Elektroforéza probíhala 30 minut při 110 V.

Po skončení elektroforézy jsme gel vyjmuli a pomocí transiluminátoru s UV světlem jsme DNA vizualizovali, čímž jsme si ověřili přítomnost ampliconů před začátkem DGGE.

4.6 Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE

Vzorky byly analyzovány metodou PCR-DGGE. Denaturační gradientové elektroforéze předcházela reakce PCR, kde byla cílová molekula amplifikována a následně byla provedena agarózová elektroforéza, kterou se ověřilo, zda PCR reakce proběhla správně a amplifikace byla dostatečná.

4.6.1 Příprava DGGE gelu

Denaturační gradientovou gelovou elektroforézu jsme provedli na sestavě pro DGGE Protean II system od firmy Bio-Rad. Postupovali jsme podle manuálu výrobce, který je dostupný na webové stránce <http://www.bio-rad.com/en-cz/product/dcode-universal-mutation-detection-system?ID=b06708b1-b4d2-4ac4-a32b-c696666a4f90>.

Pro analýzu jsme připravili gel s denaturační silou v rozmezí 35 - 60% podle Tabulky 3.

Tabulka 3: Příprava gelu pro DGGE

Koncentrace	35%	60%
40% Akrylamid	5,560 ml	5,560 ml
50× TAE	0,500 ml	0,500 ml
Formamid	3,500 g	6,000 g
Močovina	3,675 g	6,300 g
Voda	12,250 ml	9,500 ml

40% akrylamid jsme připravili rozpuštěním 38 g akrylamidu a 2 g bis-akrylamidu ve 100 ml vody. K přípravě gelu byla použita deionizovaná voda. Rozpuštění močoviny jsme urychlili mícháním na magnetické míchače.

Abychom získali denaturační gel, využili jsme systému spojených nádob, které jsme nejprve pročistili deionizovanou vodou. Následně jsme do nádoby, která byla blíž k výpusti, nalili 60% roztok. Do vzdálenější nádoby jsme nalili 35% roztok. V dolní části byl gel tvořen roztokem o vyšší koncentraci denaturačních látek (formamidu a močoviny) a směrem nahoru, k jamkám, do kterých se později aplikovaly vzorky, se koncentrace snižovala důsledkem ředění méně koncentrovaného roztoku.

Pro přípravu gelu jsme do aparatury umístili dvě skla pro DGGE a pevně utáhli svorkami tak, aby gel při plnění po stranách neunikal. Do prostoru mezi skly jsme vložili jehlu výpustě míchačky. U spojených nádob jsme zapnuli maximální možné míchání a do obou roztoků jsme přidali 20 μ l TEMED a 200 μ l 10% amonium persulfátu sodného. Obě tyto přísady sloužily k polymeraci gelu. Na závěr jsme spojili nádoby a zapnuli čerpadlo. V okamžiku, kdy byla hladina gelu asi 1–5 mm od okraje skel, vyjmuli jsme jehlu z prostoru mezi skly, přesunuli ji do odpadní nádoby a systém jsme opakovaně promyli deionizovanou vodou. Do gelu jsme ihned po dokončení plnění vložili hřebínek k tvorbě jamek pro následné nanášení vzorku. Gel jsme nechali 45 minut zpolymerovat.

Do tanku na elektroforézu jsme nalili asi 7 l 1× koncentrovaného TAE pufru, který jsme získali naředěním 50× koncentrovaného zásobního roztoku. Pufr jsme nechali ohřát na 60 °C.

4.6.2 Spuštění DGGE

Bočnice se skly a gelem jsme vyjmuli ze stojanu a nasadili do vnitřní části DGGE aparatury.

Celý systém jsme vložili do tanku s pufrem. Jednotlivé jamky jsme propláchli a nanесли 30 μl vzorku. Krajiní jamky zůstaly bez vzorku. Na přístroji jsme nastavili 30 V a spustili jsme elektroforézu. Pipetováním vzorku došlo k mírnému ochlazení pufru. Z tohoto důvodu jsme nastavili 55 V až poté, co se pufr ohřál zpět na 60 °C. Elektroforéza probíhala 18 hodin.

4.6.3 Ukončení DGGE

Vypnuli jsme zdroj napětí a vyhřívání. Víko jsme odkryli asi po minutovém intervalu, když elektrody vychladly.

Do misky jsme si připravili 50 ml 1 \times TAE pufru a 5 μl interkalační barvy SYBR Green. Rozebrali jsme sestavu skel a gelu, u kterého jsme si označili začátek elektroforézy. Gel jsme nechali 30 minut barvit v pufru s barvou. Gel byl vizualizován transiluminátorem pod UV světlem a zdokumentován systémem GelDoc (Biorad).

4.6.4 Sekvenace DNA fragmentů z DGGE

Na obrázku gelu, který jsme si vytiskli inverzně, tzn. světlý gel s černými proužky, jsme si vyznačili ty, které budou pro další zpracování významné. Pod UV světlem jsme je skalpelem vyřízli a umístili do 1,5 ml mikrozkušavky se 100 μl sterilní deionizované vody. Směs jsme promíchali a centrifugovali 10 minut při 10 000 rpm (bez chlazení). Tímto procesem jsme docílili získání DNA, která byla v gelových špalicích.

Takto získanou nukleovou kyselinu jsme amplifikovali metodou PCR. Do mikrozkušavky jsme dali 5 μl centrifugované směsi, 1 μl F primeru 341 (sekvence CCTACGGGAGGCAGCAG), 1 μl R primeru 534, 15 μl PCR mixu a 8 μl deionizované vody pro PCR. Program je totožný s programem pro DGGE. Po skončení amplifikace jsme zkontrolovali reakci agarózovou elektroforézou, kde jsme získali 1 produkt o velikosti asi 200 bp.

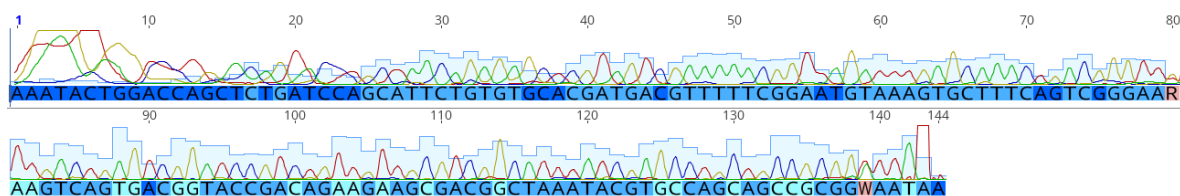
PCR směs jsme přečistili kitem QIAquick PCR purification Kit od firmy QIAGEN. Postupovali jsme dle návodu dostupného na webových stránkách <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=390a728a-e6fc-43f7-bf59b12091cc4380&lang=en>.

V poměru 5 : 1 jsme smísili pufr PB a PCR směs určenou k přečištění. K navázání DNA jsme použili kolonu QIAquick dodávanou výrobcem kitu, kterou jsme vložili do 2 ml zkumavky. Při pokojové teplotě a $17\,900 \times g$ jsme 40 vteřin obsah centrifugovali. Odstranili jsme tekutinu, která po centrifugaci zůstala na dně zkumavky, a kolonu jsme vrátili zpět. Ke vzorku jsme přidali 0,75 ml pufru PE a za stejných podmínek jsme opět 40 vteřin centrifugovali. Tekutinu ve zkumavce jsme odstranili a kolonu umístili zpět do totožné zkumavky. Centrifugaci jsme znovu opakovali, abychom odstranili zbylý pufr, který nebyl při předchozí centrifugaci odstředěn. Kolonu jsme poté umístili do čisté 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. K eluci DNA jsme použili pufr EB. Do středu kolonové membrány jsme přidali 50 μ l tohoto pufru a 1 minutu centrifugovali. Abychom dosáhli maximálního zisku DNA z membrány, přidali jsme po centrifugaci 30 μ l elučního pufru a nechali 1 minutu stát. Poté jsme centrifugaci opakovali. Pomocí přístroje Nanodrop jsme u přečištěné DNA změřili čistotu a koncentraci.

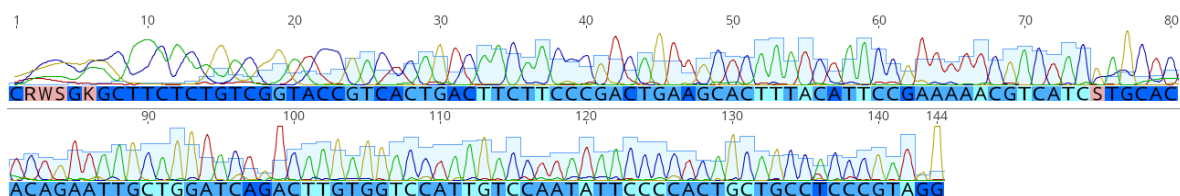
Sekvenování DNA provedla firma SEQme, která nabízí nejen Sangerovo, ale i NGS sekvenování. Pro identifikaci mikroorganismů na melanomech byla zvolena metoda Sangerova sekvenování pro PCR produkty. Vzorky k sekvenaci jsme připravili podle požadavků firmy. Nejdříve jsme PCR směs přečistili dle výše uvedeného postupu a poté připravili směs templátu a primeru. Podle koncentrace DNA zjištěné pomocí nanodropu jsme odebrali u jednotlivých vzorků právě takový objem, aby výsledná koncentrace odpovídala 50 ng (př. u vzorku byla naměřena koncentrace 25 ng/ μ l, pro sekvenaci byly potřeba 2 μ l). K templátu jsme přidali 2,5 μ l vlastního 10 μ M primeru 34IFP nebo 534R. Směs jsme doplnili vodou na celkový objem 10 μ l. Vzorky jsme následně odeslali ke komerčnímu sekvenování.

4.7 Analýza sekvencí

Firma SEQme dodala výsledné sekvence ve formátu ABI. Data jsme zpracovali v programu Geneious v 11.1.2. Program je dostupný na webové stránce www.geneious.com.

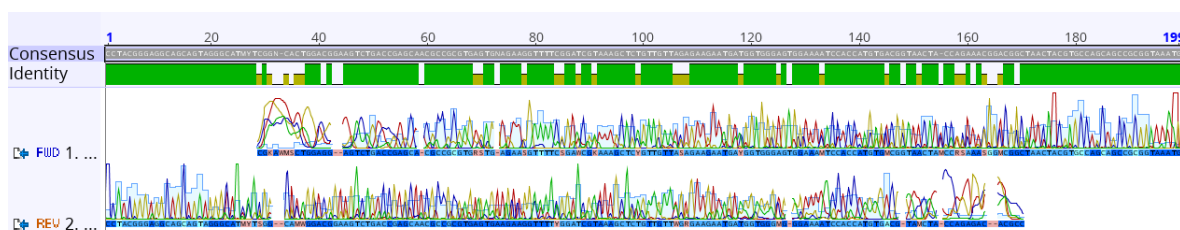


Obrázek 2: Chromatogram sekvenátoru – vzorek 4F



Obrázek 3: Chromatogram sekvenátoru – vzorek 4R

Obrázek 2 a Obrázek 3 zobrazují chromatogram vzorku č. 4., který byl stejně jako všechny ostatní vzorky označený dvěma primery. Sekvence proběhla z obou stran fragmentu a v programu byly tyto chromatogramy na základě shody bází spojeny v jeden (Obrázek 4).



Obrázek 4: Srovnání chromatogramu 4F a 4R

Chromatogramy jsme exportovali do formátu FASTA. Získali jsme zápis sekvence nukleotidů (Obrázek 5), který jsme porovnávali s databází NCBI algoritmem BLAST dostupným na webové stránce <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

```
>01 A new nucleotide sequence entered manually
CTACSGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACSCAAGTCTGATGGAGCACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGTTNTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACTGGCCTT
TATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGRTAATAA
>02 A new nucleotide sequence entered manually
CTACGGGWGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG
TGATGAAGGTCTTTCGGATCGTAAARCTCTGTRRTTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGCAC
ATCTTGACGGTACCTAAYCAGAAAGCCACGGCTWACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA
>03 A new nucleotide sequence entered manually
YCYTACGGGWGGCAGCAGTAGGAWTCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTCTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTGTGC
ACATCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAMGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTA
```

Obrázek 5: Sekvence nukleotidů – formát FASTA

5 VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA

Izolaci DNA jsme provedli celkem z 90 vzorků. Jednalo se o seškraby z kůže a melanomu. V Tabulce 4 jsou vybrány vzorky, které byly odebrány v 10. týdnu věku zvířete.

- N101/7 – progredující. Samec narozen 24. 10. 2017. Černé barvy, mnohočetné melanomy. Vzorek odebrán z melanomu na hřbetu. Úhyn v 10. týdnu.
- N101/8 – progredující. Samec narozen 24. 10. 2017. Černé barvy, mnohočetné melanomy. Odebrán vzorek z melanomu na hřbetu. Úhyn v 11. týdnu.
- N101/9 – regredující. Samice narozena 24. 10. 2016. Černé barvy, málo postižené zvíře. Celkem měla dva melanomy, vzorek byl odebrán z melanomu na rozhraní přední končetiny a hřbetu.
- P109 – progredující. Samice narozena 13. 6. 2015. Černé barvy, na těle mnohočetné melanomy. Odebrán vzorek z melanomu na hřbetu. Úhyn v 10. týdnu.
- P123 – progredující. Narozeno 6. 7. 2015. Černé barvy, na těle mnohočetné melanomy. Vzorek odebrán z melanomu na hřbetu. Úhyn v 11. týdnu.
- K5/10 – regredující. Samec narozen 10. 11. 2016. Černé barvy, silně postižené zvíře. Mnohočetné melanomy, drobné melanomy a névy. Vzorek odebrán z melanomu na hřbetu.
- K5/11 – regredující. Samec narozen 10. 11. 2016. Černé barvy, mnohočetné melanomy, névy, slabé vybělování. Vzorek odebrán z melanomu na hřbetu.
- K5/12 – regredující. Samice narozena 10. 11. 2016. Černé barvy, mnohočetné melanomy, vybělování. Vzorek odebrán z melanomu na hřbetu.
- L325/6 – regredující. Samice narozena 22. 11. 2017. Černé barvy, po těle mnohočetné melanomy a rozsev drobných névů bez známek vybělování. Odebrán vzorek z melanomu na hřbetu.
- L325/7 – regredující. Samice narozena 22. 11. 2017. Černé barvy, mnohočetné melanomy a drobné névy. Bez známek vybělování. Odebrán vzorek z melanomu na hřbetu.

- L325/8 – regredující. Samice narozena 22. 11. 2017. Černé barvy, po těle mnohočetné melanomy, rozsev drobných névů bez známek vybělování. Vzorek odebrán z melanomu na hřbetu.
- L325/9 – regredující. Samec narozen 22. 11. 2017. Černé barvy, na těle mnohočetné melanomy a drobné névy, bez známek vybělování. Vzorek byl odebrán z melanomu na hřbetu.

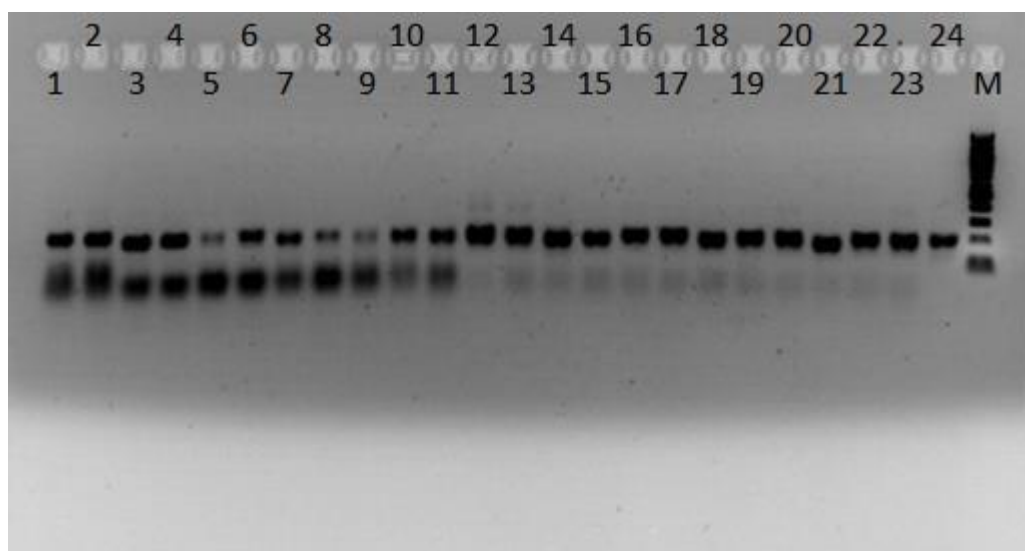
Tabulka 4: Izolace DNA ze vzorků odebraných v 10. týdnu věku zvířete

Číslo vzorku	Zvíře	Stáří	Místo odběru	Koncentrace [ng/μl]	A 260/280
1	N101/7	10	kůže	33,9	1,384
2	N101/7	10	melanom	283,2	1,743
3	N101/8	10	kůže	218,4	0,903
4	N101/8	10	melanom	302,5	1,044
5	N101/9	10	kůže	2,4	1,110
6	N101/9	10	melanom	187,3	1,826
7	P109	10	kůže	7,837	1,606
8	P109	10	melanom	10,891	1,224
9	P123	10	kůže	6,3	1,564
10	P123	10	melanom	4,5	1,317
11	K5/10	10	kůže	12,1	1,000
12	K5/10	10	melanom	155,6	1,786
13	K5/11	10	kůže	6,5	1,473
14	K5/11	10	melanom	72,4	1,782
15	K5/12	10	kůže	124,7	0,723
16	K5/12	10	melanom	365,0	0,917
17	L325/6	10	kůže	1,2	1,162
18	L325/6	10	melanom	170,4	1,818
19	L325/7	10	kůže	151,0	0,805
20	L325/7	10	melanom	349,3	1,301
21	L325/8	10	kůže	2,5	2,286
22	L325/8	10	melanom	7,8	1,515
23	L325/9	10	kůže	6,797	1,307
24	L325/9	10	melanom	142,339	1,601

Stáří prasat je uvedeno v týdnech. Poměr absorpance při vlnových délkách 260 a 280 nm vyjadřuje čistotu DNA. Jedná se o poměr absorpčních maxim DNA a bílkovin. Hodnota čisté DNA je vyšší než 1,8. Pokud je nižší jak 1,8, vzorek byl pravděpodobně kontaminován bílkovinami.

5.2 Agarózová elektroforéza

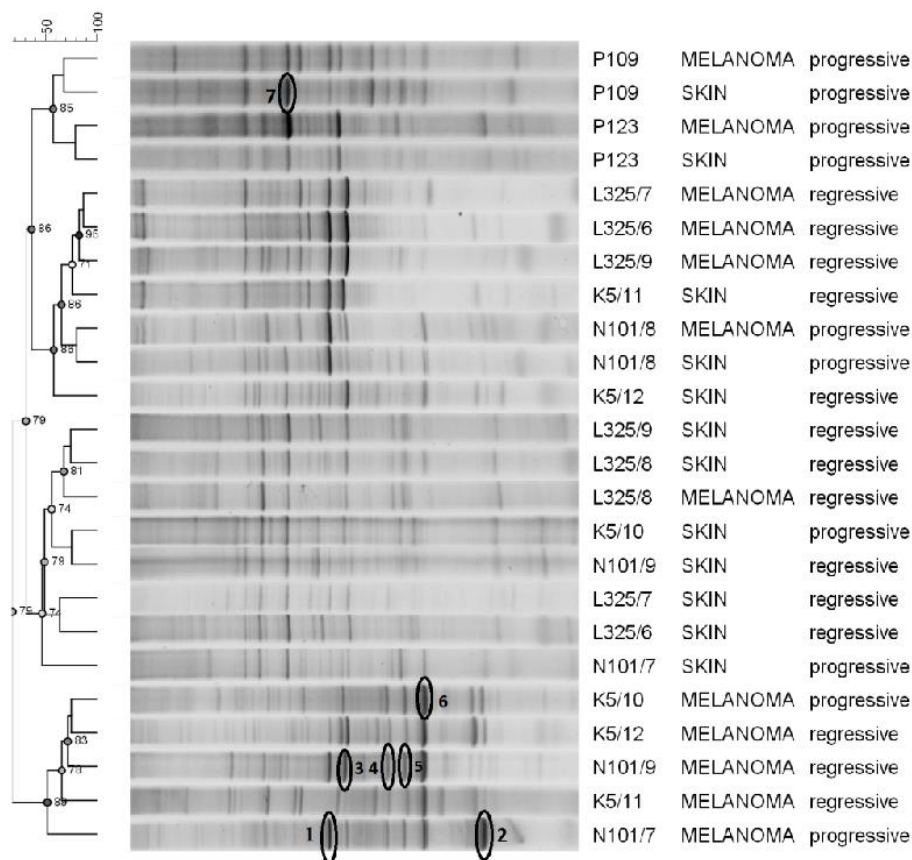
Na Obrázku 6 je v prvním sloupci písmenem M označena dráha hmotnostního standardu DNA marker 100–1 500 (Top-bio), podle něhož jsme mohli porovnat fragmenty DNA ostatních vzorků a určit tak jejich přibližnou velikost. Tato elektroforéza sloužila pouze jako kontrola, zda amplifikace proběhla a dál jsme neanalyzovali vzorek, ve kterém by nebylo dostatečné množství DNA. Souvislá linie proužků odpovídá fragmentům DNA o velikosti 200 bp. Číselné označení drah souhlasí s číslem vzorku v Tabulce 4.



Obrázek 6: Kontrolní agarózová elektroforéza

5.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Maximální kapacita DGGE se liší v závislosti na použitém hřebínku, který vytváří jamky pro nanášení vzorku. Jedná se obvykle o 20–25 jamek, přičemž krajní jsme pro analýzu nevyužívali. DGGE jsme několikrát opakovali a podle tloušťky a výskytu fragmentů DNA vybírali vhodné pro sekvenaci.



Obrázek 7: DGGE gel. V gelu jsou graficky vyznačeny fragmenty DNA určené k sekvenaci

Po dokončení elektroforézy a vizualizaci gelu bylo vybráno 7 fragmentů DNA, které byly osekvenovány. Za předpokladu, že v jedné linii se nachází DNA stejné bakterie, jsme si mohli subjektivně vybrat ty nejvhodnější pro sekvenaci. Z tohoto důvodu nebyl od každého vzorku vybrán jeden fragment. Zhodnotily se gely všech proběhlých reakcí DGGE a z nich se zpracovali k sekvenaci nejreprezentativnější fragmenty, u nichž bylo patrné, že se vyskytují u více vzorků ze stejného materiálu a obsah DNA bude pro úspěšnou sekvenaci dostatečný. Ze všech gelů bylo k sekvenaci zasláno 48 fragmentů DNA.

5.4 Bioinformatická analýza nukleotidových sekvencí

K identifikaci mikroorganismů podle jejich nukleotidových sekvencí jsme využili srovnávání s genetickou databází. Algoritmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) porovnal studovanou sekvenci mikroorganismu se sekvencemi mikroorganismů dříve identifikovanými a vybral několik zástupců, které se v dané sekvenci shodují.

Na webové stránce https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch jsme zadali sekvenci každého vzorku, kterou jsme měli ve formátu FASTA. Z dostupných databází jsme vybrali bakteriální 16S rRNA, se kterou byly námi získané sekvence porovnávány.

Konkrétně u vzorku č. 4, který je zmiňován v kapitole Analýza sekvencí se jednalo o druh *Fusobacterium necrophorum* (Obrázek 8).

Description	Total score	Ident	Accession
Fusobacterium necrophorum strain JCM 3718 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	318	99%	NR_114400.1
Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme strain Fn524 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	318	99%	NR_104683.1
Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme strain DSM 19678 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	318	99%	NR_115077.1
Fusobacterium necrophorum strain ATCC 25286 16S ribosomal RNA, partial sequence	316	99%	NR_042365.1
Fusobacterium equinum strain JCM 11174 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	302	98%	NR_113379.1
Fusobacterium equinum strain VPB 4027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	302	98%	NR_028933.1

Obrázek 8: Identifikace mikroorganismu vzorku č. 4

5.5 Přehled identifikovaných mikroorganismů

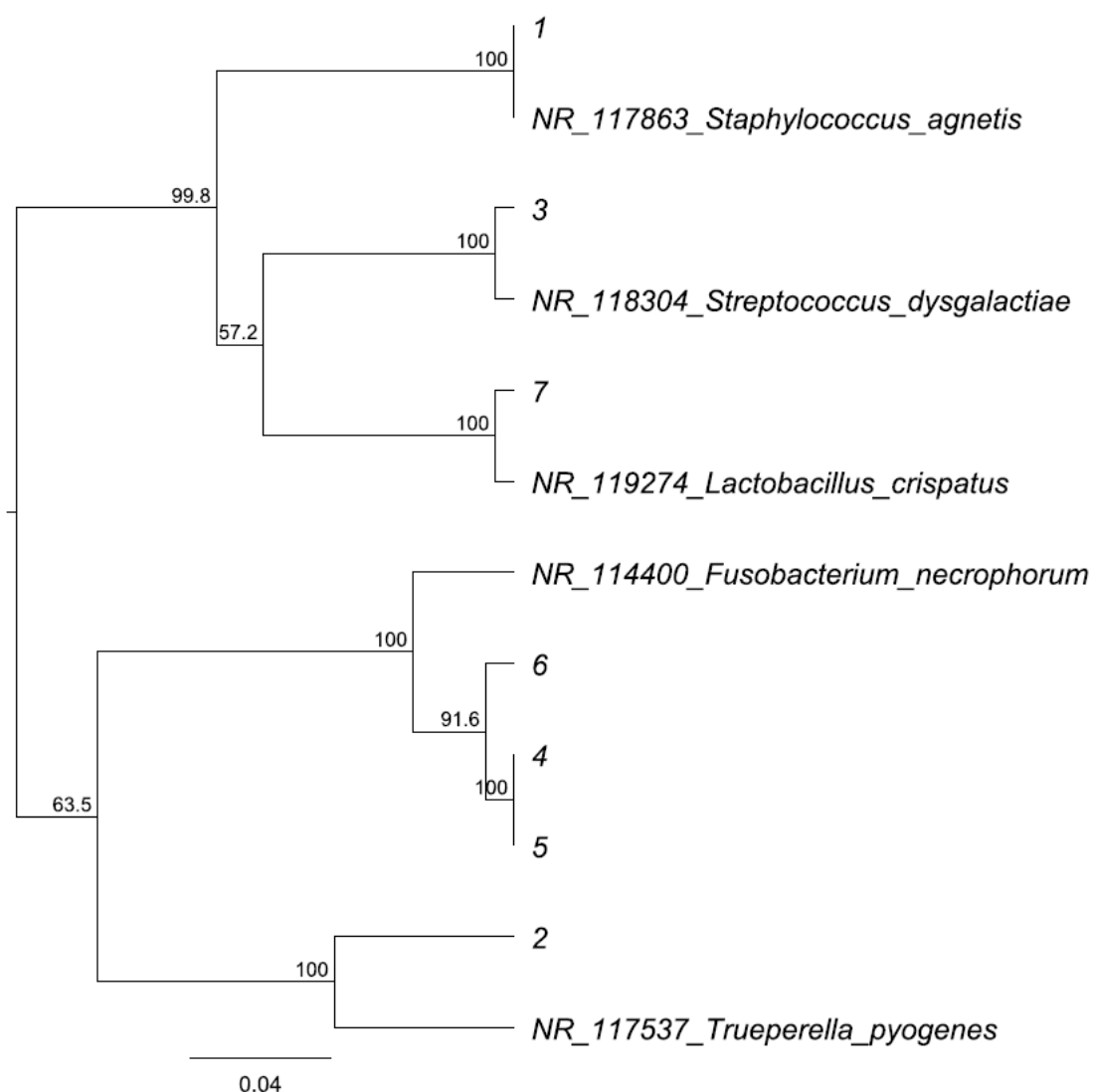
Všechny výsledky byly zpracovány stejným postupem jako vzorek č. 4 v předchozí kapitole. Ze sedmi vzorků jsme identifikovali šest bakterií vyskytujících se na melanomu a jednu, která je součástí fyziologické mikroflóry kůže (fragment 7).

Tabulka 5: Identifikace bakterií ze vzorků odebraných v 10. týdnu

Fragment	Bakterie	Identita	Místo odběru	Označení
1	<i>Staphylococcus agnetis</i>	99%	melanom	NR_117863
2	<i>Trueperella pyogenes</i>	99%	melanom	NR_117537
3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	99%	melanom	NR_118304
4	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	98%	melanom	NR_114400
5	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	99%	melanom	NR_114400
6	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	98%	melanom	NR_114400
7	<i>Lactobacillus crispatus</i>	99%	kůže	NR_119274

V programu Geneious jsme vytvořili fylogenetický strom, který graficky znázorňuje příbuznost mezi taxonomickými druhy identifikovanými ze vzorků odebraných v 10. týdnu. Pod čísly 1–7 jsou ukryty sekvence přímo z fragmentů a číselně souhlasí s označením v Tabulce 5. Větev označená kódem a pojmenováním vychází z databázové sekvence bakterie, která měla největší shodu s komerčně získanou sekvencí. Z obrázku je patrné, že sekvence DNA získaná z fragmentu 1 se stoprocentně shoduje se sekvencí z databáze.

Obdobě to platí i u 3., 7. a 2. fragmentu. Vysokou shodu vykazuje i 4. fragment, 5. a 6. se nepatrně liší. Celá tato trojice je nejbližší sekvenci bakterie *Fusobacterium necrophorum*.



Obrázek 9: Fylogenetický strom bakterií

Aby bylo možné zhodnotit diverzity mikrobiomu kůže a melanomu, jsou v Tabulce 6 uvedeny všechny bakterie, které bylo možné analýzou sekvencí taxonomicky zařadit. U některých vzorků bylo již při zpracování v programu Geneious patrné, že nebude pravděpodobně možné přesně identifikovat bakterie ze všech zpracovaných fragmentů z gelu. Ve většině případů došlo k tomu, že báze nebylo možné správně rozpoznat a ve výsledném chromatogramu bylo namísto některého ze čtyř písmen charakterizující stavební jednotky DNA uvedeno písmeno, které poukazovalo na chybu při čtení sekvence. Pokud bylo ve vzorku takovýchto chyb několik, sekvence nebyla dostatečně reprezentativní a vzorek proto nemohl být identifikován. Z celkového počtu 48 fragmentů nebylo identifikováno 8 z nich.

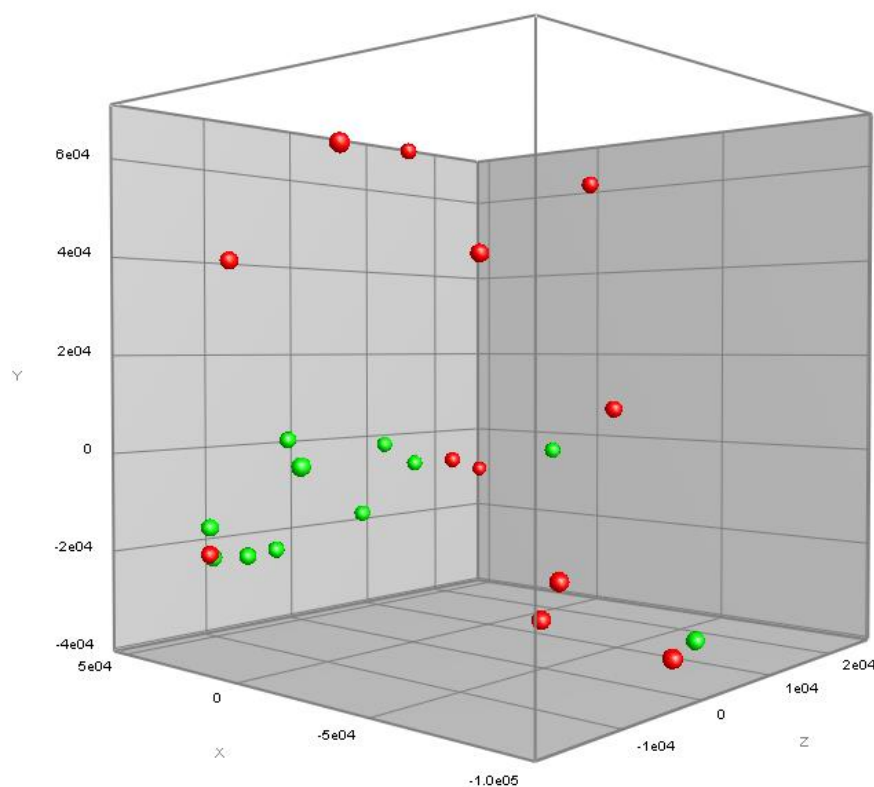
Tabulka 6: Identifikace bakterií

Bakterie	Identita	Místo odběru	Označení
<i>Lactobacillus</i>	97%	Kůže	NR_119274
<i>Staphylococcus</i>	97%	Melanom	NR_037007
<i>Staphylococcus</i>	98%	Melanom	NR_117863
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	99%	Melanom	NR_114400
<i>Staphylococcus equorum</i>	98%	Melanom	NR_027520
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	96%	Melanom	NR_118304
<i>Trueperella pyogenes</i>	92%	Melanom	NR_117537
<i>Staphylococcus</i>	93%	Kůže	NR_117863
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	87%	Kůže	NR_118304
<i>Kosmotoga olearia</i>	82%	Melanom	NR_044583
<i>Staphylococcus equorum</i>	96%	Kůže	NR_027520
<i>Turicibacter sanguinis</i>	91%	Kůže	NR_028816
<i>Treponema amylovorum</i>	91%	Střed melanomu	NR_026377
<i>Spirochaeta</i>	84%	Střed melanomu	NR_102960
<i>Staphylococcus</i>	97%	Melanom	NR_117863
<i>Trueperella pyogenes</i>	97%	Melanom	NR_117537
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	99%	Melanom	NR_114400
<i>Staphylococcus</i>	91%	Melanom	NR_117863
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	97%	Melanom	NR_118304
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	98%	Melanom	NR_114400
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	98%	Melanom	NR_114400
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	99%	Melanom	NR_117566
<i>Lactobacillus</i>	93%	Kůže	NR_119274
<i>Trueperella pyogenes</i>	99%	Melanom	NR_117537
<i>Staphylococcus</i>	100%	Melanom	NR_117863
<i>Staphylococcus</i>	99%	Melanom	NR_117863
<i>Papillibacter cinnamivorans</i>	100%	Kůže	NR_025025
<i>Staphylococcus</i>	97%	Melanom	NR_113351
<i>Turicibacter sanguinis</i>	96%	Kůže	NR_028816
<i>Streptococcus</i>	94%	Kůže	NR_152063
<i>Lactobacillus</i>	94%	Kůže	NR_119274
<i>Staphylococcus</i>	88%	Melanom	NR_115938
<i>Staphylococcus equorum</i>	93%	Melanom	NR_027520
<i>Staphylococcus equorum</i>	96%	Kůže	NR_027520
<i>Staphylococcus</i>	100%	Melanom	NR_117863
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	95%	Melanom	NR_118304
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	92%	Melanom	NR_042365
<i>Staphylococcus</i>	100%	Melanom	NR_117863
<i>Lactobacillus</i>	99%	Melanom	NR_119274
<i>Streptococcus</i>	83%	Melanom	NR_113594

V Tabulce 6 jsou uvedena rodová, popřípadě druhová jména identifikovaných bakterií. Identitou je myšlena procentuální shoda analyzované sekvence se sekvencí mikroorganismu identifikovaného databází. Identifikace bakterie na více jak 97 % je považována za

dostatečnou. Naopak u vzorků, kde byla shoda menší než 96 %, je možné, že sekvence analyzovaného mikroorganismu není reprezentativní nebo ještě není v databázi a byla vybrána bakterie, která již součástí databáze je a s analyzovanou bakterií má největší shodu. Pod kódem uvedeným v posledním sloupci lze nalézt podrobnější informace o bakteriích jako například taxonomické zařazení nebo částečnou sekvenci genu.

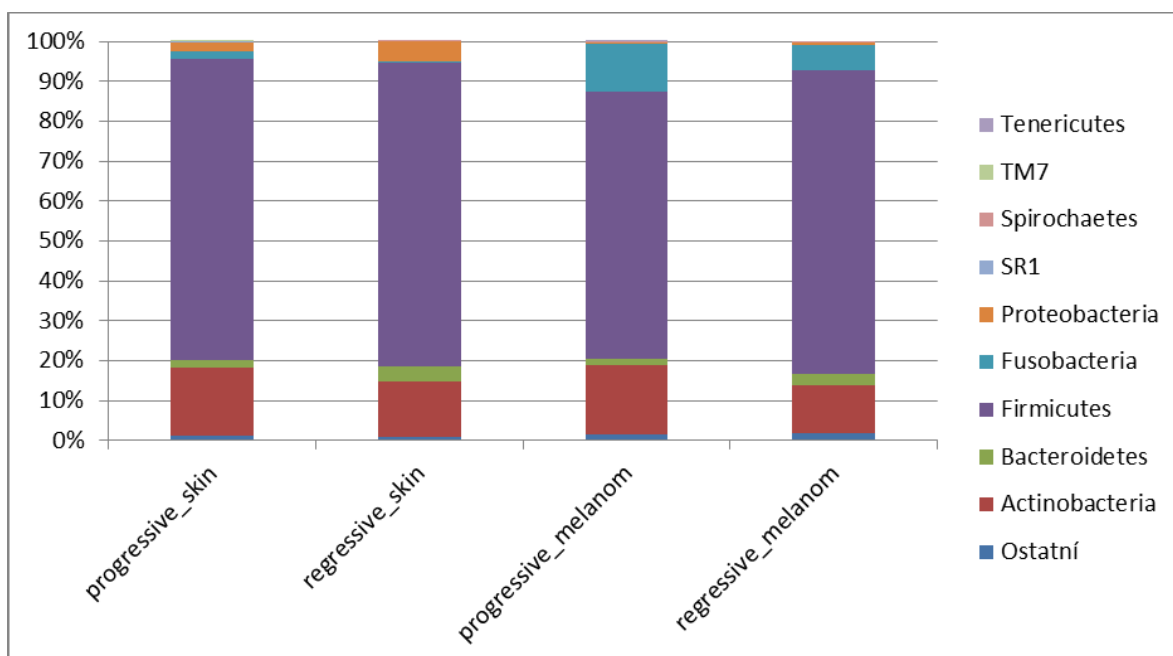
Na Obrázku 10 je graficky zobrazena bakteriální diverzita pomocí Pearson's Correlation of Principal Coordinate Analysis (PCoA). Jedná se o statistickou metodu, která se využívá k vizualizaci skupinových rozdílů. Červené body znázorňují bakterie nacházející se na melanomové tkáni, zelené zastupují kožní mikrobiom. V tomto případě je použita vážená analýza, která porovnává sady kvantitativně.



Obrázek 10: PCoA plot

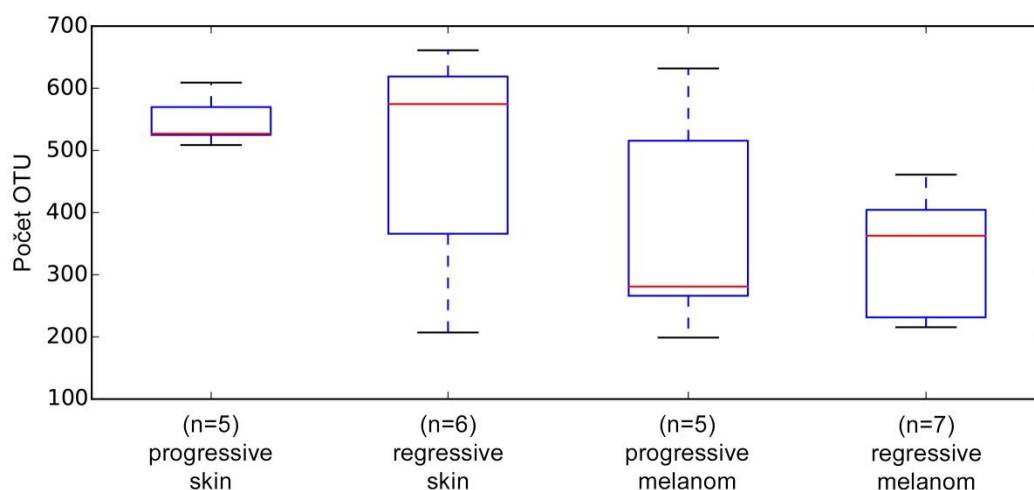
Použitá metoda PCR-DGGE patří mezi nástroj kvalitativní analýzy. V tomto případě jsou tedy výstupem konkrétní druhy mikroorganismů zastoupené na melanomové a kožní tkáni. Pro kvantitativní zhodnocení by bylo nezbytné využít metody, které toto umožňují, jako je například qPCR nebo NGS. Paralelně s metodou PCR-DGGE byla v rámci tohoto

výzkumu prováděna i technologie NGS, která je mimo požadovaný rozsah této práce. Na Obrázku 11 je zobrazen sloupcový graf kvantitativně charakterizující mikrobiální populaci, který je použit z článku, jenž komplexně pojednává o celé problematice. TM7 a SR1 je označení pro skupiny bakterií, které zatím nebyly izolovány a dosud nejsou pojmenovány.



Obrázek 11: Kvantitativní charakteristika mikrobiální populace kožní a melanomové tkáně (Mrázek, 2018)

Na Obrázku 12 je graficky znázorněn počet mikrobiálních druhů. Z obrázku je patrné, že na melanomové tkáni je v porovnání s kůží počet mikroorganismů snížený.



Obrázek 12: Boxploty hodnotící kvantitativní osídlení tkáně mikroorganismy (Mrázek, 2018)

6 DISKUZE

Hlavním cílem práce bylo stanovení mikrobiálních diverzit na povrchu melanomové tkáně a kůže za použití molekulárně-biologických metod. Mikroflóra je pojem označující soubor všech bakterií, virů, hub, a dalších eukaryotních organismů žijících v daném čase na hostiteli. Skladba mikroorganismů žijících uvnitř a vně těla taxonomicky podobných druhů je obdobná, neplatí však, že je identická. Její složení je ovlivněno například aktuálním zdravotním stavem hostitele, prostředím a v neposlední řadě i genetikou.

Vzhledem k tomu, že nebyla k výzkumu použita lidská kůže a melanom, bylo nezbytné využít laboratorní model, jehož složení mikrobiální flóry se bude maximálně podobat lidskému mikrobiomu. Toto kritérium splňuje prasečí tkáň, v tomto případě se jednalo o MeLiM, model liběchovských miniprasat. Jedná se o transgenní organismy chované v Liběchově pro výzkumné účely. Opakovaným křížením se rodí nové generace, které kožní nádor od předků zdědily (Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017).

Ze seškrabů nádorové a zdravé tkáně jsme izolovali DNA mikroorganismů. Vzorky kůže obsahují relativně málo bakterií a hlavně spoustu hostitelské DNA. Ověřili jsme si, že naší metodou lze získat bakteriální DNA vhodnou k molekulárně genetickým analýzám diverzit. Abychom získali dostatečné množství nukleové kyseliny k identifikaci bakterií, izolovanou DNA jsme amplifikovali metodou polymerázové řetězové reakce. Využili jsme primery, které se specificky navázaly na úsek DNA, který kóduje gen pro 16S ribozomální RNA. Skládá se z devíti variabilních oblastí označovaných V1 až V9. Celková délka genu je přibližně 1 500 bp. Pro fylogenetické studie se využívá variabilní úsek V3, který je dlouhý asi 200 bp. Tento gen není jediným, ale velmi často užívaným markerem pro identifikaci mikroorganismů. Vhodnou alternativou jsou *cpn60* a *rpoB* geny, které mají oproti genu 16S rRNA výhody například v délce (v některých případech je nezbytné, aby byla přečtena celá sekvence genu), neboť jejich délka je menší než 750 bp. Nevýhodou těchto genů je nedostatečná komplexnost druhových databází (Inglis, 2012).

Směs amplikonů jsme rozdělili denaturační gradientovou gelovou elektroforézou. Jedná se o modifikaci klasické polyakrylamidové elektroforézy, do jejíhož gelu jsou přidány látky způsobující denaturaci dvouvláknové DNA. Obvykle se jedná o formamid a močovinu. Do okamžiku denaturace se pohybuje molekula DNA rychlostí, která je předurčena její molekulovou hmotností a nábojem. Dvouvláknová DNA je krom jiných vazeb spojena

vodíkovými můstky. Mezi párem AT jsou dva, mezi GC jsou tři a rychlost rozvolnění dvouvlákna tedy závisí na počtu GC párů, jejichž oddělení je komplikovanější. Tato metoda je oproti klasické elektroforéze náročnější na přípravu a provedení, ale umožňuje rozdělit úseky DNA podle nukleotidových sekvencí.

Gel jsme obarvili barvivem SYBR Green a vizualizovali transiluminátorem pod UV světlem. V programu GelDoc jsme snímek gelu dále zpracovávali. Vybrali jsme fragmenty, které byly dostatečně silné (vysoký obsah DNA) a zastoupeny v několika různých vzorcích, abychom zahrnuli do zpracování bakterie, které budou patřičně reprezentovat mikrobiom. Fragmenty DNA jsme zaslali do firmy SEQme, která vzorky osekvenovala Sangerovou metodou.

Sekvence nukleových kyselin jsme porovnávali s databázemi dostupnými na webu a podle shody přiřazovali názvy bakterií jednotlivým fragmentům. Na základě taxonomické shody jsme zhotovili fylogenetický strom, kde jsou podle příbuznosti druhů bakterie rozděleny. Vytvořili jsme PCoA plot, ve kterém je schematicky rozdělena mikrobiální populace kožní a melanomové tkáně.

Bakteriální složení mikrobiomu se lišilo v závislosti na místě, ze kterého byl vzorek odebrán. Potvrdila se tak počáteční hypotéza, kdy jsme předpokládali, že mezi kožní a melanomovou tkání budou přítomny mikrobiální diverzity. Bakteriální kmen *Firmicutes* byl přítomen na kůži zvířat, jejichž dominantními bakteriemi byly rody *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Lactobacillus*. U melanomové tkáně byl kromě kmenu *Firmicutes* prokázány také rod *Fusobacterium* a kmen *Actinobacteria*. Bakterie kmenu *Firmicutes* a rodu *Trueperella* byly přítomny v mikrobiomu melanomu pouze tehdy, když byl současně vysoký výskyt rodů *Staphylococcus* a *Streptococcus*.

Vzhledem k tomu, že byla během výzkumu prokázána rozdílná diverzita mezi melanomovou a kožní tkání, mohou tyto výsledky sloužit jako základ pro další studie zabývající se nemocemi a konkrétně pak rakovinou kůže, kde se při chorobných stavech mění složení mikrobiální flóry.

V roce 2015 byl vydán článek finského původu, který popisuje výzkum zabývající se kožním mikrobiomem u melanocytů a melanocytárních névů. Vzorky byly na rozdíl od našeho projektu odebírány pacientům. U obou skupin nebyla v období experimentu

podávána žádná antibiotika, která by mohla ovlivnit složení mikrobiomu. K analýze mikrobiomu byl taktéž využit gen kódující 16S rRNA, u finského výzkumu využili úseků V1-V3, my jsme se zaměřili konkrétně na variabilní část V3. K určení sekvence genu použili zahraniční pracovníci technologii 454 a výsledek porovnali s databází SILVA. Nejčastějším bakteriálním rodem kožní tkáně byl *Propionibacterium*, dále následoval rod *Corynebakterium* a *Staphylococcus*. U melanomové tkáně neprokázali signifikantní změny, poukázali pouze na celkově menší počet bakteriálních kmenů v porovnání se zdravou tkání. Mikrobiom melanomu zhodnotili pouze kvantitativně, neboť výsledky nepovažovali za statisticky významné a z tohoto důvodu nepokládali kožní mikrobiom za vhodný diagnostický prostředek k diagnostice melanomu (Salava, 2016).

My jsme se naopak snažili získat kvalitativní výsledky, abychom mohli porovnat diverzity ve skladbě konkrétních rodů. V mikrobiálním složení zdravé kůže jsme došli k obdobným výsledkům, avšak i u melanomové tkáně jsme našli několik konkrétních rodů, které byly ve větším počtu zastoupeny. Tento aspekt s výše uvedenou literaturou není možné zhodnotit, neboť melanomový mikrobiom hodnotila pouze kvantitativně.

Na základě dostupné literatury se můžeme domnívat, že změny ve složení mikrobiomu nejsou vázány pouze na rakovinu kůže. V článku z roku 2011 je zhodnocena mikrobiální flóra kolorektálního karcinomu a zdravé střevní tkáně. Výzkumní pracovníci neprokázali zvýšený nárůst potenciálních patogenních bakterií, ale některé druhy byly přece jen výrazněji zastoupeny. Týkalo se to bakterií *Coriobacteridae*, *Roseburia*, *Fusobacterium* a *Faecalibacterium*. Tyto druhy patří ke střevním komenzálům a podle autorů je mikrobiální posun patrně způsoben dramatickými změnami, které v nádorové tkáni probíhají (Marchesi, 2011).

7 ZÁVĚR

Normální kožní mikroflóra, jakožto mikrobiální osídlení hostitelského organismu, může být ovlivněna řadou nejrůznějších onemocnění. Nejčastěji se jedná o nemoci banálnějšího charakteru jako akné či atopický ekzém. Velmi často se však v populaci vyskytují lidé, kteří onemocněli mnohem závažnějším, v některých případech dokonce fatálním onemocněním, kterým je kožní nádor, konkrétně melanom. Přestože se v současné době výzkumu nádorových onemocnění věnuje poměrně mnoho vědecký pracovišť, spojení nádorů a mikrobiomu není ve většině studií hlavní myšlenkou.

Cílem tohoto projektu bylo porovnání mikroflóry melanomové a kožní tkáně a porozumět tak mikrobiálním diverzitám, které mohou přímo souviset s nádorovým onemocněním. K výzkumu byla vybrána prasata, jejichž kožní mikrobiom je velmi podobný lidskému. Z tohoto důvodu mohou být výsledky považovány za vypovídající ve vztahu k lidskému organismu.

Výzkumem byla prokázána rozdílná diverzita mikrobiální populace na melanomové tkáni a kůži. Výsledky mohou být aplikovány do praxe a přinést nové možnosti způsobu léčby nádorových onemocnění kůže. Z literatury, která je součástí rešerše, je u jiných experimentů zabývajících se nádorovými onemocněními patrné, že námi prokázané bakteriální druhy na nádorové tkáni se nevyskytují pouze na melanomu, ale například i na karcinomu tlustého střeva. Lze tedy předpokládat, že by mohly výsledky využít nejen lékaři kožních nádorů, ale i dalších onkologických odvětví.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP – Adenosin trifosfát

AV ČR – Akademie věd České republiky

bp – Pár bází (base pair)

cDNA – DNA vzniklá reverzní transkripcí (complementary DNA)

CNS – Centrální nervová soustava

ddNTP – Dideoxyribonukleotid trifosfát

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

dNTP – Deoxyribonukleotid trifosfát

dsDNA – Dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová

GIT – Gastrointestinální trakt

HCl – Kyselina chlorovodíková

kbp – Tisíc párů bází (kilo base pair)

MeLiM – Liběchovské miniprase s melanomem (melanoma libechov minipig)

mRNA – Mediátorová RNA (messenger RNA)

NaCl – Chlorid sodný

NGS – Sekvenování nové generace (next generation sequencing)

OTU – Operační taxonomická jednotka

PCR – Polymerázová řetězová reakce

qPCR – Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RNA – Ribonukleová kyselina

rRNA – Ribozomální RNA (ribosomal RNA)

RT-PCR – Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce

TBE – Tris-borát-EDTA

TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

454 (Roche), 2014. *Labguide* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://labguide.cz/454-roche/>

ADAMCOVÁ, Gabriela, 2010. *Mikroflóra trávicího systému člověka*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

ADAM, Zdeněk, Jana KOPTÍKOVÁ a Jiří VORLÍČEK, 2003. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Vyd. 1. Praha: Grada. ISBN 80-247-0677-6.

BEDNÁŘ, Marek, 1999. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.

BROWN, T., 2007. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-1719-6.

Česká republika a rakovina v číslech, 2011. *Linkos: Národní onkologický program* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>

DVOŘÁKOVÁ, Magdaléna, 2007. *Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce RNDr. Irena Koutná, Ph.D.

GRICE, Elisabeth, 2014. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. *Pubmed* [online]. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085669>

HAMPLOVÁ, Lidmila, 2015. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. 1. vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7387-934-1.

HEJDUKOVÁ, Markéta, 2014. *Úroveň znalostí laické veřejnosti o prevenci melanomu*. Plzeň. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni. Vedoucí práce Mgr. Soňa Loudová.

INGLIS, Douglas, 2012. Molecular Methods to Measure Intestinal Bacteria. *Pubmed* [online]. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468337>

JANOCHOVÁ, Jana, 2009. *Izolace DNA: Výtěžnost a kvalita*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

JEBAVÝ, Lukáš, 2011. *Chov laboratorních zvířat: [učební text pro vyučovaný předmět Chov laboratorních zvířat]*. Vyd. 1. V Praze: Česká zemědělská univerzita. ISBN 978-80-213-2176-2.

JULÁK, Jaroslav, 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum. ISBN 8024612704.

KOČÁREK, Eduard, 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-807-0134-504.

KRAJSOVÁ, Ivana, 2008. *Atlas kožního melanomu: klinika, morfologie, stadium a prognóza = Color atlas of cutaneous melanoma : clinics, morphology, stage and prognosis*. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-807-3451-516.

KRAJSOVÁ, Ivana a Jan BAUER, 2017. *Melanom: imunoterapie a cílená léčba*. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-807-3455-156.

KRŠKA, Zdeněk, David HOSKOVEC a Luboš PETRUŽELKA, 2014. *Chirurgická onkologie*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-802-4742-847.

LEY, Ruth E., 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Pubmed* [online]. USA [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649005/>

LYSKOVÁ, Lucie, 2008. *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce RNDr. Iveta Valášková.

MARCHESI, Julian R., 2011. Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. *Plos one* [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020447#s3>

MĚŠŤÁK, Jan, Martin MOLITOR, Ondřej MĚŠŤÁK a Lucie KALINOVÁ, 2015. *Základy plastické chirurgie*. 2. vyd. V Praze: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-802-4628-394.

Mikroflóra lidského organismu, 2018. *Lékařská fakulta Masarykovy univerzity* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/mikrobiologie_lidskeho_organismu.pdf

MRÁZEK, Jakub, 2018. Melanoma related changes of skin microbiome. *Folia Microbiologica*.

MURRAY, Patrick, Ken ROSENTHAL a Michael PFALLER, 2009. *Medical microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier. ISBN 978-032-3054-706.

MURRAY, Patrick, Ken ROSENTHAL a Michael PFALLER, 2016. *Medical microbiology*. 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier. ISBN 9780323299565.

MUYZER, Gerard, 1992. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Pubmed* [online]. Nizozemsko [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202176/>

OLIVOVÁ, Jana, 2016. *Liběchovské biomedicínské modely pro výzkum závažných chorob* [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://www.avcr.cz/cs/pro-media/aktuality/Libechovske-biomedicinske-modely-pro-vyzkum-zavaznych-chorob>

OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ, 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. 1. vyd. V Praze: Karolinum. ISBN 978-802-4621-098.

PIZINGER, Karel, 2003. *Kožní pigmentové projevy*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 80-247-0616-4.

Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017. *Česká televize* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://www.ceskatelevize.cz/ct24/veda/2052434-prase-ktere-si-samo-vyleci-rakovinu-kuze-prazsti-vedci-vytvorili-unikat>

RICHARD A. HARVEY, , PAMELA C. CHAMPE a BRUCE D. FISHER, 2007. *Microbiology*. 2. ed., 2. printing. Philadelphia, Pa. ISBN 07-817-8215-5.

RŮŽIČKOVÁ, Eliška, 2012. *Real - time PCR a jeho využití pro subtypizaci difúzního velkobuněčného lymfomu*. Olomouc. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Mgr. Jana Kučerová.

SALAVA, Alexander, 2016. Skin microbiome in melanomas and melanocytic nevi. *Pubmed* [online]. Helsinky, Finsko [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26680010>

Sekvenování nové generace, 2014. *Labguide* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>

SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4747-712.

SOBOTKA, Pavel, 2012. *Patologická fyziologie: praktikum*. 4., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-802-4621-289.

ŠMARDA, Jan, 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-802-1038-417.

ŠŤASTNOVÁ, Lenka, 2007. *Prevence maligního melanomu kůže*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Mgr. Andrea Hudáčková.

VORLÍČEK, Jiří, Jitka ABRAHÁMOVÁ a Hilda VORLÍČKOVÁ, 2012. *Klinická onkologie pro sestry*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4737-423.

ZBOŘIL, Vladimír, 2005. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. Vyd. 1. Praha: Grada. ISBN 80-247-0584-2.

ZVÁROVÁ, Jana a Ivan MAZURA, 2012. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. 1. vyd. Praha: Karolinum. Biomedicínská informatika. ISBN 978-802-4621-500.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Liběchovské miniprase MeLiM (Prase, které si samo vyléčí rakovinu kůže, 2017)	22
Obrázek 2: Chromatogram sekvenátoru – vzorek 4F	42
Obrázek 3: Chromatogram sekvenátoru – vzorek 4R	42
Obrázek 4: Srovnání chromatogramu 4F a 4R.....	42
Obrázek 5: Sekvence nukleotidů – formát FASTA	42
Obrázek 6: Kontrolní agarózová elektroforéza	45
Obrázek 7: DGGE gel. V gelu jsou graficky vyznačeny fragmenty DNA určené k sekvenaci	46
Obrázek 8: Identifikace mikroorganismu vzorku č. 4.....	47
Obrázek 9: Fylogenetický strom bakterií	48
Obrázek 10: PCoA plot.....	50
Obrázek 11: Kvantitativní charakteristika mikrobiální populace kožní a melanomové tkáně (Mrázek, 2018).....	51
Obrázek 12: Boxploty hodnotící kvantitativní osídlení tkáně mikroorganismy (Mrázek, 2018).....	51

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Osídlení trávicího traktu mikroorganismy (Zbořil, 2005; Bednář, 1999)	15
Tabulka 2: Objemy reaktantů při PCR reakci	37
Tabulka 3: Příprava gelu pro DGGE	39
Tabulka 4: Izolace DNA ze vzorků odebraných v 10. týdnu věku zvířete	44
Tabulka 5: Identifikace bakterií ze vzorků odebraných v 10. týdnu.....	47
Tabulka 6: Identifikace bakterií	49