



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

**Katedra biomedicínské techniky**

# **Molekulárně genetické metody studia mikrobiomu na myším modelu obezity**

## **Estimation of gut microbiome in mice obesity model by tools of molecular genetics**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Autor diplomové práce: Bc. Adéla Štěpánová  
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.  
Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

---

**Kladno 2018**

Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2017/2018

## Z a d á n í   d i p l o m o v é   p r á c e

Student: **Bc. Adéla Štěpánová**  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu  
Téma: **Molekulárně genetické metody studia mikrobiomu na myším modelu obezity**  
Téma anglicky: Estimation of gut microbiome in mice obesity model by tools of molecular genetics

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

- 1) Seznámit se s metodikou a vypracovat literární rešerši o vztahu obezity a mikrobiomu trávicího traktu (TT) a způsobech popisu mikrobiomu TT.
- 2) Seznámit se s přístrojovým vybavením nutným pro zvládnutí molekulárně genetických metod a prakticky zvládnout metody izolace DNA a RNA, amplifikace vybraných genů metodou PCR, kvantifikace mikroorganismů metodou real-time PCR, elektroforetické techniky (DGGE) a sekvenování NK, včetně statistického vyhodnocení.
- 3) S použitím výše uvedených metod srovnat mikrobiom trávicího traktu obézních a kontrolních myší za různých výživových podmínek.

### Seznam odborné literatury:

- [1] Harakeh SM, Khan I, Kumosani T, Barbour E, Almasaudi SB, Bahijri SM, Alfadul SM, Ajabnoor GMA, Azhar EI, Gut microbiota: a contributing factor to obesity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (95). doi: 10.3389/fcimb.2016.00095, 2016
- [2] Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Fahra M, The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes *Lipids in Health and Disease*, 15:108. DOI 10.1186/s12944-016-0278-4., 2016
- [3] Inglis GD, Thomas MC, Thomas DK, Kalmokoff ML, Brooks SPJ, Selinger LB, Molecular methods to measure intestinal bacteria, *J AOAC Int* 95 (1), 2012, 5-20 s.

Vedoucí: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

Zadání platné do: 20.09.2019

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 23.10.2017

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Molekulárně genetické metody studia mikrobiomu na myším modelu obezity“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

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 18.5.2018

.....

Bc. Adéla Štěpánová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Taťáně Jarošíkové, CSc. za odborné vedení práce, za cenné rady a připomínky. Mé velké poděkování patří i Ing. Jakubu Mrázkovi Ph.D. za poskytnutí příležitosti podílet se tomto výzkumu, odborný dohled, ochotu, trpělivost a za pomoc při práci v laboratoři i při samotném zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Chahrazed Mekadim, MSc. za velkou pomoc v laboratoři a při vyhodnocování výsledků. Mé díky patří všem ostatním pracovníkům Laboratoře anaerobní mikrobiologie za rady a příjemně strávené chvíle. Moc děkuji i mé rodině a přátelům za podporu během studia.

Tato práce byla podpořena grantem MŠMT CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000460.

# **ABSTRAKT**

## **Molekulárně genetické metody studia mikrobiomu na myším modelu obezity**

Obezita a metabolické poruchy s ní související jsou charakterizovány specifickými změnami ve složení a funkci intestinálního mikrobiomu, který se aktivně podílí na mnoha hostitelských fyziologických procesech. Změněná střevní mikrobiální kompozice společně s genetickými predispozicemi může přispět k metabolickým poruchám hostitele.

S použitím molekulárně genetických metod pro analýzu bakteriální diverzity je cílem srovnat mikrobiom trávicího traktu obézních a kontrolních myších modelů (samci C57BL/6N) za různých výživových podmínek. Použité metody jsou gelová elektroforéza v denaturačním gradientu (DGGE) s následnou sekvenací vybraných úseků (bandů) podle Sangerova a Sekvenování nové generace (NGS) za využití platformy Ion Torrent.

Byly analyzovány rozdíly v diverzitě střevní mikrobioty caeca a colonu v závislosti na druhu diety a zároveň byly patrné fenotypové rozdíly myších modelů. Vysokotuková dieta oproti standardní dietě zvýšila u mikrobiomu obou traktů poměr Firmicutes k Bacteroidetes, potravinové doplňky (omega-3 kyseliny) měly tendenci posunout složení mikrobiomu zpět směrem k STD dietě, výraznější změny byly pozorovány u caeca. Byly zaznamenány například rozdíly v zastoupení bakterií řádu Clostridiales a Bacteroidales, konkrétněji čeledi S24-7, Lachnospiraceae nebo Prevotellaceae.

## **Klíčová slova**

Mikrobiom trávicího traktu, obezita, myší model obezity, molekulárně genetické metody, sekvenování DNA



# **ABSTRACT**

## **Estimation of intestine microbiome in mice obesity model by tools of molecular genetics**

Obesity and its associated metabolic disorders are characterized by specific changes in structure and function of an intestinal microbe, which is actively involved in many of host's physiological processes. Changes of the intestinal microbial composition along with its genetic predispositions can contribute to metabolic disorders of the host.

The goal of using several molecular methods for analysis bacterial diversity is to compare the digestive tract microbes of obese and control mouse models (C57BL / 6N males) under various nutritional conditions. The methods used for the analysis were DGGE followed by Sanger sequencing and next-generation sequencing (NGS) using the Ion Torrent platform.

Differences in the diversity of caecum and colon microbiota were analyzed, depending on the type of diet; phenotypic differences of mouse models were also observed. The high-fat diet compared to the standard diet for the microbioms of both tracts increased Firmicutes to Bacteroidetes ratio; food supplements (omega-3 acids) had tendencies to shift the microbial composition back towards to the STD diet; more significant changes were observed in the caecum. There were differences for example in the representation of the Clostridiales and Bacteroides bacteria, more specifically in the family S24-7, Lachnospiraceae or Prevotellaceae.

## **Keywords**

Gut microflora, obesity, mouse model of obesity, molecular genetic tools, DNA sequencing

# Obsah

<b>Seznam symbolů a zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Současný stav řešené problematiky</b> .....	<b>13</b>
2.1 Mikrobiom trávicího traktu.....	13
2.1.1 Složení střevního mikrobiomu.....	14
2.1.2 Funkce střevního mikrobiomu.....	16
2.2 Obezita.....	18
2.2.1 Ovlivnění kompozice střevního mikrobiomu dietou.....	19
2.3 Myší model obezity.....	21
2.4 Molekulární metody studia mikroorganismů.....	22
2.4.1 Izolace DNA.....	22
2.4.2 Stanovení kvality a koncentrace DNA.....	23
2.4.3 Izolace RNA.....	24
2.4.4 Polymerázová řetězová reakce.....	25
2.4.5 Kvantitativní PCR.....	27
2.4.6 Purifikace nukleových kyselin.....	29
2.4.7 Elektroforetické separace nukleových kyselin.....	30
2.4.8 Sekvenování nukleových kyselin.....	33
2.5 Cíle práce a hypotézy.....	36
<b>3 Metody</b> .....	<b>37</b>
3.1 Myší model.....	37
3.1.1 Experimentální diety.....	38
3.2 Sběr vzorků.....	40
3.3 Izolace DNA.....	41
3.4 Amplifikace 16s rRNA – PCR.....	43
3.5 Agarózová elektroforéza.....	44
3.6 Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE.....	45
3.6.1 Příprava roztoků.....	45

3.6.2	Sestavení aparatury, nalití gelu a nanesení vzorků.....	45
3.6.3	Barvení a vyhodnocení .....	47
3.6.4	Identifikace bakterií z DGGE gelu .....	47
3.6.5	Sangerovo sekvenování .....	48
3.7	Stanovení mikrobiální diverzity metodou NGS .....	49
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>59</b>
4.1	Tělesná hmotnost myší.....	59
4.2	Vzorky a DNA .....	59
4.3	PCR-DGGE.....	62
4.4	NGS.....	69
4.4.1	Caecum .....	70
4.4.2	Colon .....	73
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>82</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>83</b>
	<b>Příloha A: Izolace DNA, koncentrace, ředění DNA .....</b>	<b>92</b>
	<b>Příloha B: Namíchání vzorků pro Sangerovo sekvenování .....</b>	<b>94</b>
	<b>Příloha C: Protokol pro Ion OneTouch™ 2 Instrument.....</b>	<b>95</b>
	<b>Příloha D: Protokol pro Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit .....</b>	<b>100</b>
	<b>Příloha E: Maps – QIIME.....</b>	<b>104</b>
	<b>Příloha F: Analýza NGS dat ve formátu *.fastq - QIIME .....</b>	<b>106</b>
	<b>Příloha G: Obsah příloženého CD .....</b>	<b>107</b>



# Seznam symbolů a zkratek

## Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
$A$		Absorbance
$\epsilon$	$(\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$	Extinkční koeficient
$l$	m	Délka dráhy paprsku

## Seznam zkratek

Zkratka	Význam
LPS	Lipopolysacharid
SCFA	Mastná kyselina s krátkým řetězcem
WHO	World Health Organization
ssDNA	Single-stranded DNA
dsDNA	Double-stranded DNA
A260	Absorbance DNA při použité vlnové délce 260 nm
A280	Absorbance DNA při použité vlnové délce 280 nm
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytosintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
dTTP	Deoxythymidintrifosfát
ddNTP	Dideoxyribonukleotidtrifosfát
ddATP	Dideoxyadenosintrifosfát
ddCTP	Dideoxycytosintrifosfát
ddGTP	Dideoxyguanosintrifosfát
ddTTP	Dideoxythymidintrifosfát
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce, real-time PCR
EtBr	Ethidium bromid
pb	Páry bází
kb	Kilobáze
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
NGS	Sekvenování nové generace
TT	Trávicí trakt
STD	Standard
EPA	Kyselina eikosapentaenová
DHA	Kyselina dokosahexaenová
IRT	Inhibitor Removal Technology
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TAE	Tris-acetát-EDTA
OTU	Operační taxonomická jednotka

# Seznam obrázků

Obrázek 2.1: Myší model obezity [29, 30] .....	22
Obrázek 2.2: Průběh řetězové polymerázové reakce [43].....	27
Obrázek 2.3: qPCR za použití interkalačního barviva SYBR Green [45] .....	28
Obrázek 2.4: Průběh reakce qPCR [46] .....	29
Obrázek 2.5: Průběh reakce qPCR, kvantifikační cyklus [46].....	29
Obrázek 2.6: Ilustrace separovaných fragmentů DNA na gelu, velikost jednotlivých fragmentů se určuje podle markeru obsahujícího fragmenty o známé délce [51] .....	31
Obrázek 2.7: DGGE [54] .....	32
Obrázek 2.8: DGGE gel .....	32
Obrázek 2.9: Elektroforegram, počítačový výstup nukleotidové sekvence .....	34
Obrázek 3.1: Myší model, kmen C57BL/6 [64] .....	38
Obrázek 3.2: Graf složení vysokotukové cHFc diety, ze které vycházejí další druhy v experimentu použitých diet .....	39
Obrázek 3.3: Složení diet použitých v experimentu. Chow = STD [79].....	40
Obrázek 3.4: Trávicí trakt myši, upraveno [68] .....	40
Obrázek 3.5: QIAamp® PowerFecal ® DNA Kit .....	43
Obrázek 3.6: Spojené nádoby a čerpadlo .....	46
Obrázek 3.7: Elektroforetická vana na DGGE.....	46
Obrázek 3.8: Soubor Maps.txt .....	56
Obrázek 3.9: Maps11, obsah složky mapping file pro vzorek se Sample ID 11.....	56
Obrázek 4.1: Graf zobrazující průměrnou tělesnou hmotnost myši na konci experimentu .....	59
Obrázek 4.2: Caecum – DGGE gel pro diety cHFc, cHFc – F a Krill – H.....	62
Obrázek 4.3: Caecum – DGGE gel pro diety Krill – L, Cal – L, STD.....	63
Obrázek 4.4: Colon – DGGE gel pro diety cHFc, cHFc – F a Krill – H .....	63
Obrázek 4.5: Colon – DGGE gel pro diety Krill – L, Cal – L, STD.....	64
Obrázek 4.6: Fylogram vytvořený v programu Geneious.....	66
Obrázek 4.7: PCA analýza pro caecum: cHFc, cHFc – F, Krill – H.....	67
Obrázek 4.8: PCA analýza pro caecum: Krill – L, Cal – L, STD .....	67
Obrázek 4.9: PCA analýza pro colon: cHFc, cHFc – F, Krill – H.....	68
Obrázek 4.10: PCA analýza pro colon: Krill – L, Cal – L, STD .....	68
Obrázek 4.11: Informace o průběhu NGS pro caecum .....	69
Obrázek 4.12: Informace o průběhu NGS pro colon .....	69
Obrázek 4.13: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni řádu u caeca a colonu .....	70
Obrázek 4.14: Nevážená analýza PCoA pro colon i caecum.....	70
Obrázek 4.15: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni kmene u caeca. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.....	71

Obrázek 4.16: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni čeledi u caeca. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.....	71
Obrázek 4.17: Nevážená analýza PCoA pro caecum.....	72
Obrázek 4.18: Caecum: znázornění bakteriální diverzity .....	72
Obrázek 4.19: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni kmene u colonu. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.....	73
Obrázek 4.20: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni čeledi u colonu. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.....	74
Obrázek 4.21: Nevážená analýza PCoA pro colon .....	74
Obrázek 4.22: Colon: znázornění bakteriální diverzity .....	75

## Seznam tabulek

Tabulka 2.1: Mikrobiom, jeho účinky a vztah k obezitě [1, 6, 8, 12]......	15
Tabulka 3.1: Rozdělení vzorků do skupin podle diet.....	41
Tabulka 3.2: Reagencie použité pro izolaci DNA (QIAamp® PowerFecal® DNA Kit) .....	41
Tabulka 3.3: Reagencie pro reakci PCR [53]......	43
Tabulka 3.4: Detaily programu PCR-DGGE [53]......	44
Tabulka 3.5: Reagencie potřebné pro přípravu 3 gelů na agarózovou elektroforézu.....	44
Tabulka 3.6: Reagencie pro přípravu roztoků na DGGE gel .....	45
Tabulka 3.7: Reagencie pro reakci PCR z fragmentů gelu .....	47
Tabulka 3.8: Reagencie pro PCR na NGS .....	49
Tabulka 3.9: Detaily programu pro amplifikaci 16S rRNA pro NGS.....	50
Tabulka 3.10: Reagencie pro směs v kroku „End repair“ .....	50
Tabulka 3.11: Reagencie pro směs v kroku Ligace adaptorů .....	51
Tabulka 3.12: Uspořádání vzorků s přiřazenými barkódy (pro caecum).....	51
Tabulka 3.13: Reagencie pro směs v kroku Amplifikace .....	52
Tabulka 3.14: Detaily programu pro amplifikaci DNA .....	53
Tabulka 3.15: Reagencie pro qPCR, celkový objem reakce 20 µl.....	53
Tabulka 3.16: Schéma PCR desky pro qPCR .....	54
Tabulka 3.17: Koncentrace standardů KAPPA a ION TORRENT.....	54
Tabulka 3.18: Parametry qPCR.....	54
Tabulka 3.19: Ukázka označení vzorků – sample ID, barkód a číslo vzorku .....	56
Tabulka 4.1: Caecum: seznam zpracovávaných vzorků rozdělených podle diet, koncentrace izolované DNA.....	59
Tabulka 4.2: Colon: seznam zpracovávaných vzorků rozdělených podle diet, koncentrace izolované DNA.....	61
Tabulka 4.3: Bakterie zjištěné na základně podobnosti sekvencí ze Sangerova sekvenování a databáze NCBI ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ) .....	64

# 1 Úvod

Obezita, globálně se vyskytující epidemie moderní doby, je rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění a diabetu. Všudypřítomnost nadváhy a obezity je na vzestupu a představuje obrovskou zátěž pro zdraví. Příčinou jsou kromě sedavého životního stylu a zvýšené konzumace potravin také enviromentální vlivy, genetické faktory a změny mikrobiálního osídlení gastrointestinálního traktu. V současné době se uvádí, že interakce hostitelského organismu s jeho střevní mikroflórou jsou zahrnuty do patogeneze mnoha metabolických onemocnění, mezi které je kromě obezity zařazen například i diabetes 2. typu. V nižším lidském střevě se nachází cca  $10^{14}$  mikroorganismů a mnoho z nich si vyvinulo vzájemné nebo komenzální soužití s hostitelským organismem a aktivně se podílí na mnoha jeho fyziologických procesech. Změněná střevní mikrobiální kompozice společně s genetickými predispozicemi může přispět k metabolickým poruchám hostitele, které vedou k mnoha onemocněním. Studie ukázaly, že gastrointestinální mikrobiota mohou ovlivňovat energetickou rovnováhu, a to využitím energie ze stravy a ovlivněním hostitelských genů regulující výdej a skladování energie.

Metody založené na sekvenování DNA umožnily rozsáhlou charakterizaci gastrointestinální mikroflóry. Především sekvenování nové generace nám umožňuje během krátké doby získat informace o metagenomu bakterií nacházejících se v gastrointestinálním traktu, a to analýzou genu kódujícího 16S rRNA, který se vyskytuje v genomu všech zástupců bakterií.

Přesný přínos střevní mikroflóry k rozvoji obezity zatím ale není zjevný z mnoha důvodů, jako je složitost a rozmanitost střevních mikrobů, etnické variace u studovaných populací a velké rozdíly mezi studovanými jedinci. Nicméně modulace střevní mikroflóry má velký terapeutický potenciál pro léčbu rostoucí epidemie obezity, především v kombinaci diety a cvičení. Budoucí výzkum by se proto měl zaměřit na posouzení možnosti změny poměru kmenů bakterií Firmicutes k Bacteroidetes, jako terapeutického řešení obezity. V souvislosti s obezitou je poměr právě těchto dvou hlavních bakteriálních kmenů v lidském i myším trávicím traktu často zmiňován. Takováto změna by mohla být dosažena použitím antimikrobiálních činidel, potravinových doplňků nebo probiotik ve spojení se změnou selektivního prostředí vyvolaného přechodem na stravu s nízkým obsahem tuku nebo vysokým obsahem vlákniny.

Tato práce se zabývá molekulárně genetickými metodami pro studium mikrobiomu trávicího traktu a dále srovnává složení a diverzitu mikrobiomů myších modelů obezity a kontrolních myší, jež měly různé výživové podmínky. Výzkum byl proveden na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Laboratoři anaerobní mikrobiologie.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Mikrobiom trávicího traktu

Mikrobiom trávicího traktu zahrnuje všechny mikroorganismy zde žijící. Nejmenší zastoupení bakterií, v důsledku žaludečních enzymů a kyselého pH, je v celém žaludku,  $10^3$ - $10^4$ , dále se hustota organismů podél stravovacího kanálu zvyšuje. Dosahuje  $10^8$  až  $10^{10}$  bakterií na gram obsahu v ileu a  $10^{11}$  na gram obsahu v tlustém střevě. Mikrobiota hraje velmi významnou fyziologickou roli v důležitých procesech, jako je trávení, syntéza vitamínů (biotin, vitamín K), metabolismus xenobiotik, cukrů a aminokyselin a jiné. Dále zabraňuje kolonizaci patogeny a pomáhá při vývoji imunitního systému [1, 2, 3, 4].

Většina mikrobiálních výzkumů se v současné době zaměřuje na střevní mikroflóru, neboť se zde nachází většina bakterií. Převážná část dat je získávána ze stolice pro její snadnou dostupnost, i když výzkumy ukázaly na rozdíly v kompozici mikrobiot u fekálních vzorků a vzorků získaných biopsií sliznice. Analýza stolice tedy nemusí přesně odrážet gastrointestinální trakt. I přes to analýzy dokazují vztah mezi dietou, střevní mikroflórou a množstvím metabolických onemocnění, jako je například obezita. Přestože přesný mechanismus propojení střevní mikroflóry s obezitou není zatím přesně znám, je zjištěno, že střevní mikrobiota mohou zvýšit produkci energie z potravy, přispět k redukci zánětů v trávicím traktu a mohou regulovat složení mastných kyselin [1, 2].

Pro analýzu složení střevní mikroflóry bylo použito několika různých technik. Tradiční postupy zahrnují izolaci a kultivaci mikroorganismů v různých růstových médiích. Nicméně většina bakterií v tlustém střevě je anaerobní a v aerobních podmínkách nepřichází kultivace v úvahu. Proto kultivací může být analyzováno asi jen 30 % střevních mikroorganismů. Rozsáhlejší charakterizaci střevní mikroflóry zajišťují metody zaměřující se na detekci jednoho nebo několika markerových genů, například gen pro 16S rRNA kódující malou podjednotku ribozomální RNA. Další techniky využívají metagenomický přístup, tedy kolektivní studii všech genomů v rámci jednoho vzorku [2].

Lidské tělo obsahuje miliardy mikroorganismů, které ho obývají během celého života. Během těhotenství se začíná mikrobiom matky transformovat, v děloze matky postupně převládají druhy bakterie *Lactobacillus* a ve střevě se rozmnožují mikroby, které získávají energii z potravy účelněji. Tato skutečnost ale pravděpodobně způsobuje zánět střev, což přispívá také ke křečím a průjmům, hlavně ve třetím trimestru. Toto bylo zjištěno transplantací mikrobiomu těhotných žen (v 1., 2. a 3. trimestru) bezmikrobním myším. Zvířata s mikrobiomem 3. trimestru přibírala oproti zbylým více na váze a vykazovala řadu metabolických a imunologických změn zaznamenaných během těhotenství. První dva roky života dítěte, zejména doba před a po zavedení pevné stravy představuje masivní změny ve složení a diverzitě mikrobiomu. Zvláště důležité faktory pro vývoj mikrobiomu

je druh porodu a krmení dítěte (kojení / umělá výživa). Dle studií jsou děti narozené císařským řezem náchylnější k vývoji autoimunitních onemocnění, protože nepřijdou do kontaktu s vaginálním mikrobiomem matky. Trávicí trakt dítěte v děloze matky je neosídlen, dokud není tělo vystaveno vaginálním mikrobům při normálním porodu. Během těhotenství mají vaginální mikrobiota nižší rozmanitost a vyšší stabilitu. Dominantními bakteriemi je několik druhů *Lactobacillus*. Dalším zdrojem mikroorganismů je mateřské mléko a následujícím posunem ve vývoji mikrobiální kultury je konzumace pevné stravy. Poté zůstává střevní mikroflóra v podstatě nezměněna až do stáří, kdy se kompozice opět proměňuje [1, 5, 6].

### 2.1.1 Složení střevního mikrobiomu

Mikroby kolonizují kůži, gastrointestinální, urogenitální a horní dýchací cesty, stejně jako další místa na lidském těle. V dolním gastrointestinálním traktu se vyskytují ve vysokých koncentracích a převážná většina mikroorganismů je zde anaerobních. Střevní mikrobiom je z 99 % bakteriální, jeho součástí jsou ale i houby, prvoci a archea. Metagenom mikrobiomu je asi 100x větší než obsah lidského genomu. Přestože je složení mikrobiomu individuální, 90 % bakteriální populace spadá do dvou základních kmenů, grampozitivního Firmicutes a gramnegativního Bacteroidetes. Další významněji zastoupené kmeny jsou gramnegativní Proteobacteria nebo grampozitivní Actinobacteria [1, 7, 8, 9].

Nejhojnější rody bakterií ve zdravém střevě člověka jsou gramnegativní *Bacteroides*, *Prevotella*, *Akkermansia* a grampozitivní *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Streptococcus* [10].

Složení střevního mikrobiomu se liší od jedince k jedinci z hlediska druhu, distribuce, rozmanitosti a celkového počtu mikroorganismů. Tyto rozdíly ovlivňují faktory, jako je věk, pohlaví, geografická poloha, ale i strava, zdravotní stav, užívaná medikace a genetické predispozice hostitele. Výsledkem je, že složení střevní mikroflóry se neustále mění, což ovlivňuje zdraví a pohodu hostitele. Mezi všemi těmito faktory mají na tvarování mikrobiomu v průběhu života velmi významný vliv právě stravovací návyky, včetně konzumace alkoholu. Studie ukázaly, že užívání antibiotik vykazuje dlouhodobé snížení bakteriální diverzity. Obnovení normální mikroflóry může mít delšího trvání, v závislosti na antibiotiku a jeho spektru. Širokospektrální antibiotika, jako je clindamycin, mohou mít vliv přetrvávající až 4 roky. Stres způsobený narušením normální flóry po antibiotické léčbě vede ke zvýšené rezistenci na léčbu. Zatímco vysoká dávka antibiotik zahubí téměř všechny mikroby, při podání nižších dávek dochází ke změnám, které nepatrně zvyšují rezistenci mikrobů. Bylo také dokázáno, že užívání antibiotik v raném dětství (prvních 6 měsíců života) je spojeno se zvýšenou tělesnou hmotností, protože antibiotika zasahují do vývoje mikroflóry v těle, což může souviset s pozdější obezitou. Antibiotika také negativně ovlivňují kolonizaci bifidobakteriemi,

která se zásadně podílí na vývoji imunitního systému dítěte. Tím může být zvýšeno riziko alergií nebo astmatu [1, 6, 11].

Hlavním faktorem ovlivňujícím rozmanitost mikroflóry je dieta. Jednou z nejdůležitějších dietních strategií pro kontrolu složení a metabolické aktivity střevní mikroflóry jsou probiotika a prebiotika. Probiotika jsou nepatogenní mikroorganismy používané jako potravinové doplňky. Podávané v přiměřeném množství prospívají zdraví hostitele. Nejběžnější probiotickou potravinou je jogurt. Další potraviny obsahující probiotika jsou sýry, džusy, cereálie apod. Prebiotikum je složka potravy, kterou hostitel nemůže štěpit. Jedná se o fermentovaná dietní vlákna působící na hostitele specifickou změnou kompozice a aktivity bakterií (zejména laktobacilů a bifidobakterií) v tlustém střevě, což zlepšuje zdravotní stav hostitele. Mezi nejvíce používaná prebiotika v potravinářském průmyslu patří laktulóza a inulin, který se přirozeně vyskytuje v několika potravinách jako je pórek, cibule, pšenice, chřest, banán, sója nebo čekanka, i když by byla potřeba vysoké konzumace těchto potravin, aby byla významně změněna kompozice bifidobakterií. Aby došlo k prebiotickému účinku, je v současné době přidáván inulin do běžně konzumovaných potravin (jako jsou obiloviny, sušenky, jogurty apod.) ve vyšších koncentracích. Existuje také řada komerčně dostupných potravinových doplňků, které inulin obsahují [1, 2].

Studie ukázaly, že u obézních myší je probiotiky také regulován hormon GLP-1 (glukagon-like peptid 1), který hraje zásadní roli při přenosu signálů o nutričním a energetickém stavu střeva do centrálního nervového systému. Změny střevní mikroflóry mohou tedy stimulovat nebo potlačovat sekreci gastrointestinálních hormonů [2].

Tabulka 2.1: Mikrobiom, jeho účinky a vztah k obezitě [1, 6, 8, 12].

Firmicutes	Gram-pozitivní anaerobní bakterie produkující endospory, jeden z hlavních bakteriálních kmenů v lidském a myším střevním mikrobiomu. Souvisí s geny, které se podílejí na karbohydrátovém katabolismu. Bohatě zastoupeny u obézních jedinců, zastoupeny ve vyšší míře u evropských dětí než u dětí afrických. Po chirurgickém zákroku v žaludku (by-pass) jejich množství klesá. A pacient pozoruje dramatické zlepšení metabolismu, které nelze vysvětlit kalorickým omezením a samotnou ztrátou hmotnosti.
Enterobacter	Bakterie produkující endotoxiny. Po inokulaci bakterií gnotobiotickým myším, byla indukována obezita a rezistence na inzulín.



Bacteroidetes ( <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> )	Gram-negativní anaerobní bakterie, které nevytváří spóry. Jeden z hlavních bakteriálních kmenů v lidském a myším střevním mikrobiomu. Kmen je spojen se sníženou (normální) tělesnou hmotností. Převažuje u jedinců, v jejichž stravě se bohatě objevuje maso. Je dominující u mikrobiomu afrických venkovských dětí. Na geneticky modifikovaném myším modelu došlo při změně stravy s vyšším podílem vlákniny k obohacení kmene <i>Bacteroidetes</i> . Bacteroidetes jsou spojeny se zvýšenou absorpcí energie z potravy a s nízkým stupněm zánětu sliznice.
<i>Escherichia coli</i>	Souvisí s absencí obezity.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Pozitivně spojen s obezitou, po použití terapeutických potravin obsahujících tuto bakterii byl sledován nárůst hmotnosti u dětí se syndromem Kwashiorkor (nejrozšířenější druh podvýživy). U obézních jedinců pozorováno vyšší zastoupení tohoto druhu.
Prevotellaceae	Bakterie produkující kyslík, u obézních jedinců jsou v širším zastoupení.
<i>Prevotella</i>	Bakterie více zastoupené v trávicím traktu jedinců, kteří se živí převážně obilninami. U pacientů, kteří podstoupili operaci žaludečního by-passu, bylo pozorováno zvýšení jejich množství bakterií rodu <i>Prevotella</i> .
<i>Bifidobacteria</i>	Stimulace růstu těchto bakterií je podmíněna požíváním rostlinné stravy a mléka. Mají prospěšné účinky na zdraví. <i>Bifidobacterium breve</i> snižuje tělesnou hmotnost u obézních myší (obezita dietou vyvolaná).
<i>Lactobacillus spp.</i> ( <i>L.casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. curvatus</i> )	Pozitivní výsledky při podání těchto druhů bakterií obézním jedincům. Byl zaznamenán váhový úbytek nebo zastavení přírůstku hmotnosti (při obezitě indukované vysokotukovou dietou).

### 2.1.2 Funkce střevního mikrobiomu

Vztah střevního mikrobiomu s hostitelem může být symbiotický, komenzální (zanedbatelný účinek na fyziologii hostitele) nebo patogenní. Bylo zjištěno, že střevní mikrobiom hraje důležitou roli při trávení a absorpci jinak nestravitelných živin, stejně

jako při hospodaření s energií. Jeho diverzita je vysoce ovlivňována dietou, životním stylem hostitele a životním prostředím. Zvýšení bakterií rodu Firmicutes o 20 % a odpovídající pokles Bacteroidetes souvisí s nárůstem energetického příjmu, což vyvolává obezitu [8, 10].

### **Metabolismus živin**

Nejdůležitější funkcí střevní mikroflóry je pomoc hostiteli při trávení potravy. Zatímco všechna zvířata mohou produkovat trávicí enzymy, pouze někteří bezobratlí jako jsou měkkýši a termiti, vylučují enzymy schopné štěpit strukturální polysacharidy, například celulózu. Býložraví savci se zcela opírají o degradační vlastnosti mikroorganismů. U člověka představuje fermentace v tlustém střevě asi 10 % denního příjmu energie. Bakterie střeva také poskytují důležité živiny, jako je vitamin K [4, 11].

### **Ochrana proti patogenům**

Většina mikroorganismů je neškodná a mnoho z nich poskytuje výhody pro své hostitele. Zvyšují odolnost epitelia a sliznice střeva vůči kolonizaci patogeny, které by musely soutěžit s mikroorganismy o živiny a místo usídlení. Proliferaci patogenů je zabráněno také produkcí látek inhibující jejich růst. Vnější slizniční vrstva střevního epitelu je zodpovědná za selektivní vazbu, výživu střevních mikrobů a redukci patogenních organismů. Je tedy schopna měnit složení mikroorganismů [4, 10, 11].

### **Aktivace imunitního systému**

Jako důsledek své hlavní úlohy při zpracování potravin a extrakci živin je slizniční povrch střeva vystaven vysokému riziku napadení patogeny, které kontaminují hostitelskou stravu. Proto představuje mikrobiální flóra nenahraditelnou úlohu při obraně sliznic. Velké množství komenzálních mikrobů je distribuováno na různých místech sliznic, především v gastrointestinálním traktu a je nutné, aby byla k těmto mikrobům zachována tolerance. Mikroby se pravděpodobně vyskytují v komplexu s protilátkou IgA zabírající jejich adhezi na slizniční receptory a průniku do organismu. Protilátka ale nijak neovlivňuje životní cyklus bakterií. Pro funkci a vývoj imunitního systému je osídlení sliznic mikrobioty velmi důležité. V případě, že je vzájemný vztah mezi hostitelem a mikroflórou narušen, mohou i střevní mikrobiota způsobit nebo přispět k onemocnění [13, 14, 15].

Význam mikrobiomu gastrointestinálního traktu při vytváření mukózní imunitní odpovědi byl prokázán pomocí myši bez mikrobiomu (germ-free mouse), u kterých je mukózní imunitní systém nevyvinutý. Zvířata bez mikrobiot mají nízkou hustotu lymfoidních buněk ve sliznici střev a nízké koncentrace cirkulujících imunoglobulinů v krvi [16].

Zásadním počátečním krokem infekce je připojení patogenů na povrch intestinálního epitelu. Jako obranný mechanismus produkuje epitel hlenové a antimikrobiální látky,

kteře inhibují invazi patogenů. Vrstva hlenu tvořĩ silnou bariěru proti patogenům i proti bakteriím mikrobiomu. Tato mukóznĩ vrstva je u myšĩ bez mikrobiot mnohem tenčĩ než u standardnĩch myšĩ, což naznačuje, že mikrobiota mohou přĩpsĩvat k produkci hlenu. V souladu s touto hypotézou můžee být tloušťka mukóznĩ vrstvy u myšĩ bez mikrobiot zvyšena podáváním bakteriálních produktů lipopolysacharidů (LPS), imunologicky aktivnĩch látek [15]. LPS jsou produkovány gramnegativními bakteriemi, ale v přĩpadě vyššĩho zaplavenĩ organismu těmito látkami mohou být přĩčinou vzniku septického šoku. Dalšĩ produkty bakteriĩ vzniklé přĩ fermentaci potravy a syntéza vitamĩnů jsou důležitým zdrojem pro střevní buňky a celý organismus. Mikrobiota mohou také ovládat funkci epiteliální bariěry produkcĩ metabolitů, jako napřĩklad mastnĩch kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) [13, 15].

Sliznice střeve je hlavním rozhraním v organismu mezi imunitním systémem a vnějšĩm prostředím. Pod epitelem i těsně pod nĩm se nachází lymfoidnĩ folikuly, označovány jako organizovaný lymfatický systém, jenž je považován za místo indukce imunitnĩ reakce. Difuznĩ organizovaný lymfatický systém je tvořen B a T lymfocyty, neutrofilỹ, žĩrnými buňkami, eozinofily a makrofágy, které se difuzně rozprostĩrajĩ pod celým slizničním povrchem v lamina propria [13, 17].

Množství a rozložení lymfoidnĩch folikul se můžee měnit v závislosti na vystavenĩ antigenům. Vyššĩ počty folikul se objevují napřĩklad v nosnĩch mandlĩch, apendixu a v Peyerovĩch placĩch (tenké střevo). Bezprostředně po expozici mikrobům se ve folikulech zvyšuje počet buněk produkujejících imunoglobuliny a tím se zvyšuje i koncentrace imunoglobulinu v séru [13, 17].

## 2.2 Obezita

Obezita je multifaktoriální stav vyplývající z interakce genotypu s enviromentálními podmínkami a nese s sebou vážné zdravotnĩ důsledky, jako je zvyšené riziko diabetu 2. typu, kardiovaskulární choroby, plicnĩ hypertenze, spánková apnoe a řada nádorů. Dále je silně spojena se zvyšným rizikem úmrťĩ. Jako klinicky oběznĩ jsou podle Center pro kontrolu a prevenci nemocĩ klasifikovány osoby s indexem tělesné hmotnosti (BMI) 30 a vyššĩm. Ačkoli dostupnost a stabilita zásobování potravinami se v poslednĩch staletĩch zlepšila, lidské tělo stále zůstává fyziologicky předurčeno chránit zásoby energie prostřednictvím akumulace tukové tkáně. Podle odhadů WHO z roku 2014 se výskyt obezity od roku 1980 více než zdvojnásobil. K roku 2015 byla více než polovina evropské populace oběznĩ nebo s nadváhou. Jedním z faktorů přĩpsĩvajících k vývoji obezity je, vedle genetickĩch, enviromentálních a faktorů souvisejících s imunitním systémem, střevní mikrobiom [8, 10, 18].

Ve stavu obezity dochází ke změně střevní mikroflóry, u oběznĩch jedinců bylo vykázáno méně taxonomickĩch jednotek než u jedinců s normální váhou. Střevní mikroby mohou ovlivňovat jak přĩjem energie ze složek potravy, tak to, jak je energie

uchovávána a zpracovávána. Při sekvenování nukleových kyselin distální střevní mikroflóry u divokých myší a *ob / ob* myší (podrobněji v kapitole 2.3 Myší model obezity) byly odhaleny konzistentní rozdíly ve dvou bakteriálních kmenech, Bacteroidetes a Firmicutes. Zastoupení Firmicutes bylo vyšší, zatímco množství Bacteroidetes se navzdory podobné úrovni aktivity a stravování zredukovalo. Podobné změny byly zjištěny i u myší s dietou vyvolanou obezitou, hlavní rozdíl se týkal rozkvětu třídy bakterií nazývané Mollicutes z kmene Firmicutes [8, 18].

*Ob / ob* myší vykazují mutaci v genu na chromozomu 6 kódující leptin, který hraje velkou roli v energetické homeostáze. Studie na zvířecích modelech a u lidí s vrozeným deficitem leptinu (totálním i relativním) ukázaly, že leptin reguluje řadu fyziologických funkcí. Je vylučován pulzně, vyšší hladiny hormonu byly zjištěny večer a brzy ráno. Cirkuluje v plazmě ve volné a vázané formě. Hladiny cirkulujícího leptinu úzce souvisí s tukovou hmotou a jsou akutně citlivé na nedostatek kalorií. Po jednom dni hladovění klesají o 50 %. Leptin přenáší do hypotalamu informace týkající se množství energie uložené v tukové tkáni, jakož i akutních změn příjmu energie, které mění chuť k jídlu a ovlivňují energetické výdaje. Hladina leptinu je také regulována cytokiny a dalšími hormony, jako je inzulín nebo kortizol. Podávání leptinu *ob / ob* myším snižuje příjem stravy i tělesnou hmotnost a koriguje metabolické a endokrinní defekty spojené s obezitou [5, 19, 20, 21, 22].

Podobných výsledků, že mezi obézním a štíhlým člověkem existují rozdíly ve střevním mikrobiomu, bylo dosaženo i u člověka v malé studii jedinců, kteří podstoupili úbytek hmotnosti pomocí diet s nízkým obsahem sacharidů nebo s nízkým obsahem tuků. Objekty byly sledovány po dobu jednoho roku. Původní poměr mikrobů rodu Firmicutes a Bacteroidetes u obézních osob byl podstatně vyšší než u osob s normální hmotností. U těch objektů, kterým se podařilo úspěšně snížit hmotnost, se poměr dvou kmenů vrátil do normálu [18].

### **2.2.1 Ovlivnění kompozice střevního mikrobiomu dietou**

Střevní mikrobiom se účastní biochemických procesů hostitele, které napomáhají trávení a metabolismu potravy. Nedávné studie z roku 2015 ukázaly, že konzumace dietních emulgátorů souvisí se změnami kompozice střevního mikrobiomu. Mikrobiom obézních jedinců vykazuje odlišný metabolismus sacharidů a lipidů. Sacharidy jsou důležitým zdrojem energie, ale pro člověka nejsou všechny jejich formy stravitelné. Mezi nestravitelné sacharidy patří rostlinná vlákna (xyly, celulóza, inulín a škrob). Střevní mikrobiom přispívá k energetickému metabolismu prostřednictvím produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou syntetizovány při fermentaci zmíněných rostlinných vláken. Nejvíce produkováné mastné kyseliny jsou propionát, acetát a butyrát. Acetát a propionát je produkován kmenem Bacteroidetes, zatímco butyrát syntetizují Firmicutes. Butyrát je používán jako primární zdroj energie pro epitelální buňky tlustého střeva, propionát a acetát jsou nezbytné pro lipogenezi a glukoneogenezi v játrech. Tyto metabolity tedy mohou také působit jako signální molekuly a mohou

aktivovat další procesy v játrech a svalových tkáních, jenž spouští klíčové faktory účastníci se metabolismu cholesterolu, lipidů a glukózy [1, 2, 8].

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem rovněž modulují expanzi regulačních T-lymfocytů a produkci cytokinů, tak působí proti zánětlivým procesům a přispívají k homeostáze colonocytů [5].

U obézních a hubených myší byl pozorován rozdíl v hladinách mastných kyselin s krátkým řetězcem. V genetickém modelu obezity mají myši *ob / ob* ve srovnání s hubenými zvýšené koncentrace butyrátu a acetátu v caecu [2].

Obezita pravděpodobně souvisí se zvýšením četnosti bakterií kmenu Firmicutes, sníženým výskytem bakterií kmenu Bacteroidetes, vyšší úrovni kmene Actinobacterií, nižším podílem kmenu Verrucomicrobia a nižším množstvím *Faecalibacterium prausnitzii*. Tyto disproporce jsou spojeny se zvýšenou permeabilitou střevní stěny způsobené změnami ve složení mikroflóry, což umožňuje, aby se do oběhu dostalo více lipopolysacharidů (LPS) (kovalentně spojená molekula lipidu a polysacharidu, hlavní složka vnější membrány gramnegativních bakterií představující endotoxin, na který imunitní systém silně reaguje), to vede k aktivaci zánětlivých procesů a ke snížené schopnosti reakce tkání na inzulin, což je původcem mnoha komplexních onemocnění. Inzulinová rezistence vede k neschopnosti dilatace cév, což vede k hypertenzi [5, 8, 10, 23].

Spotřeba potravy s vysokým obsahem tuku vede, jak u lidí, tak u zvířat, k významnému zvýšení koncentrace endotoxinu a ke změnám v kompozici střevní mikroflóry. Zvýšení systémových hladin endotoxinu že být důsledkem zvýšené permeability střev. Endotoxemie může pak přispět k zánětlivému procesu, inzulinové rezistenci, zmnožení buněk tukové tkáně a ke snížení funkce  $\beta$ -buněk produkující do krve inzulin, což charakterizuje metabolický syndrom [18].

Druh přijímané potravy ovlivňuje složení a rozmanitost střevního mikrobiomu, například západní strava obsahující vysoký obsah tuku s sebou nese následek zvýšení relativního počtu Firmicutes na úkor Bacteroidetes, především třídy Mollicutes. Tyto změny byly pozorovány jak na zvířecích modelech, tak na člověku. Kmen Firmicutes souvisí s geny, jež se podílejí na metabolismu sacharidů. Obézní jedinci mají v porovnání s normálně vážícími jedinci bohatší zastoupení bakterií kmene Firmicutes a jsou méně osídleni kmenem Bacteroidetes. Podobně jsou u obézních přítomny vodík produkující bakterie čeledi Prevotellaceae. Intestinální mikrobiom se také aktivně podílí na aktivaci, metabolismu a regulaci žlučových kyselin, které jsou vylučovány z jater do trávicího systému a napomáhají při vstřebávání tuků. Abnormálně vysoké množství žlučových kyselin je spojeno s mnoha metabolickými poruchami, včetně obezity. Velkou roli v metabolismu žlučových kyselin hrají především *Clostridium scidens*, *Clostridium sordellii* a *Bacillus fragilis* (všechny kmen Firmicutes), proto každá odchylka ve složení těchto bakterií může indikovat změnu hladin žlučových kyselin vedoucí k metabolickým poruchám [8].

## 2.3 Myší model obezity

Použití myších modelů v biomedicinském výzkumu dramaticky přispělo k pokroku ve zdravotnictví. Je založeno na genetické, fyziologické, biologické a behaviorální podobnosti mezi myši a lidmi, právě proto je myš nejdůležitějším savčím modelem pro studium lidských onemocnění a lidského zdraví. Mezi výhody použití myši patří její velikost a nenáročnost chovu, snadné udržování nebo dostupnost mnoha inbredních kmenů. Jeden rok života myši představuje asi 30 let lidského života, doba života myši jsou 3-4 roky, je tedy možné v poměrně krátké době pozorovat několik generací. Dále je také známá jejich genetika, anatomie a fyziologie, což umožňuje rozpoznat způsobené změny chování. Od roku 2002 je zmapovaný myší genom, lze tedy cíleně manipulovat s myšími geny, což představuje obrovskou výhodu. Manipulací s geny a přizpůsobením podmínek můžeme napodobit lidská onemocnění nebo stavy. Mnohé z genů souvisejících s onemocněními jsou téměř totožné [24, 25, 26].

Rozpoznávání mechanismů, které jsou základem metabolických onemocnění je náročné. Důvodem je jejich polygenní etiologie, která zvyšuje riziko onemocnění v kombinaci s tolerantním prostředím. Mnoho různých typů buněk i interakce mezi tkáněmi a orgány (svaly, játra, pankreas, tuková tkáň) zastupuje metabolickou regulaci a může přispět k vytvoření klinického fenotypu. Při zjišťování mechanismů je nutno porozumět tomu, jak genotyp interaguje s prostředím a jak je interakce ovlivněna funkcí buněk, tkání nebo orgánů [27].

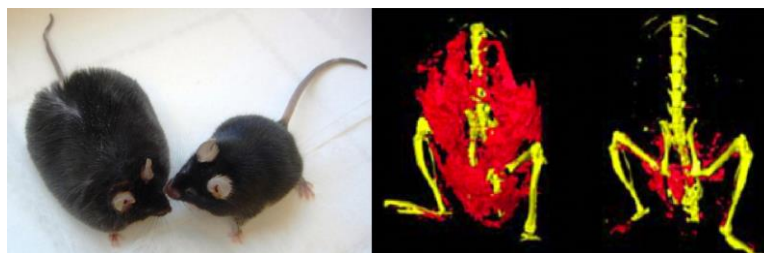
Vzhledem k tomu, že s lidskými geny není možné zatím manipulovat, je klíčem k porozumění metabolickým onemocněním vývoj zvířecích modelů, jenž umožňují propojení genů ve specifických buňkách, tkáních nebo orgánech s konkrétními fenotypovými vlastnostmi. Manipulace, které jsou nezbytné pro výzkum intestinálního mikrobiomu, zahrnují manipulaci s hostitelským genetickým pozadím a manipulaci s kompozicí střevní mikroflóry. Protože se většina případů lidské obezity považuje za polygenní, což vyplývá z aktivity mnoha genů a každá nese nějaký rizikový faktor, rozdělujeme zvířecí modely obezity do různých kategorií. Hlavní kategorie jsou založeny na mutacích nebo manipulaci jednoho nebo několika genů [12, 27, 28].

Kromě modelů, kde je obezita vyvolána vysokotukovou dietou, jsou často používané také obézní (*ob / ob*) myši, které byly objeveny v roce 1949 kvůli náhodné mutaci. Tato mutace byla následně převedena na pozadí inbredního kmenu C57BL/6J. Homozygotní zvířata s touto změnou měla téměř trojnásobnou tělesnou hmotnost oproti kontrolním skupinám stejného kmene. Bylo zjištěno, že došlo k mutaci genu kódující leptin, který je produkován bílou tukovou tkání, hraje klíčovou roli v energetické homeostáze a má anorektické účinky. Napomáhá regulaci chuti k jídlu a také rozhoduje o uložení nebo spotřebování energie. Proto mají *ob / ob* myši trvalý pocit hladu. V důsledku mutace spotřebují myši nadměrné množství potravy a stávají se těžce obézními se zvýšeným příjmem potravy, vyšší hladinou cukru v krvi, zvýšenou koncentrací inzulínu v krvi,

vysokými hladinami kortikosteroidů, sníženou činností štítné žlázy a poruchami metabolismu tuků (zvýšená hladina cholesterolu). Gen kódující leptin je u myši lokalizován na 6. chromozomu, u lidí na 7. Jeho mutace předčasně ukončuje syntézu leptinu [20, 21, 22, 27, 28].

Ačkoli výsledky experimentů přinesly významný průlom v pochopení vztahu mezi střevní mikroflórou a hostitelem, aplikovat takové výsledky z myších modelů na člověka není možné. Je třeba vzít v potaz existenci některých klíčových rozdílů mezi oběma systémy. Jedním rozdílem je místo, kde dochází k hlavní fermentaci sacharidů, u myši v caecu, zatímco u člověka je fermentace vázána na tlusté střevo. Tento rozdíl pravděpodobně ovlivňuje rozmanitost a složení střevních mikrobiálních komunit [12].

Na obrázku 2.1 je zobrazen myší model obezity. Vpravo snímek z počítačové tomografie určené pro malá zvířata, zobrazení tukových dep u obézní a hubené myši (tuk červeně, kosti žlutě).



Obrázek 2.1: Myší model obezity [29, 30]

## 2.4 Molekulární metody studia mikroorganismů

### 2.4.1 Izolace DNA

Jednou z úvodních metod, které jsou použity při získávání genetického materiálu z experimentálního organismu, je extrakce a izolace DNA. Cílem je získat dostatečné množství genetického materiálu pro další analýzu. O úspěšnosti dalších analýz rozhoduje také kvalita izolované DNA. O použití metody izolace rozhoduje následná analýza, časové možnosti a náklady. Všechny metody extrakce se skládají ze čtyř kroků: 1. příprava vzorku, která může zahrnovat promývání, homogenizaci a odstraňování větších částic; 2. lýza buněk, která se typicky provádí souběžně s inaktivací nukleáz přidáváním různých detergentů, chaotropních činidel nebo rozpouštědel; 3. odstranění kontaminujících negenomických materiálů a inhibitorů PCR; 4. získání purifikované nativní DNA [31, 32].

Pro získání mikrobiální DNA lze použít i komerčně dostupné sady. Každá sada obsahuje návod a veškerý materiál, jako jsou kolonky s filtrem, mikrozkuhavky Eppendorf a chemikálie. Námí užitá izolační sada QIAamp PowerFecal DNA Kit je určena pro izolaci a pročištění mikrobiální DNA z obsahu trávicího traktu hostitelského



organismu. QIAamp kity se používají pro jednoduchou izolaci nukleových kyselin ze vzorků a jsou založeny na principu silikagelové membrány, na kterou se nukleové kyseliny vážou. Následuje eluce do pufrů nebo vody. Čistota DNA extrahované z fekálních vzorků je klíčovou otázkou citlivosti a užitečnosti biologických analýz jako je PCR, qPCR, Sangerovo sekvenování a NGS. Kvalita analýzy nakonec závisí na účinnosti lýzy všech mikroorganismů ve vzorku [32, 33].

Mezi nejčastěji používané metody izolace bez užití komerční sady patří DNA extrakce s užitím TRI reagentu, jinak nazývaná fenol-chloroformová extrakce. Jedná se o poměrně pracnou metodu trvající několik hodin, avšak poskytuje velké množství čisté DNA. Fenol a chloroform jsou chemikálie nemísící se s vodou. Po přidání směsi k materiálu, ze kterého chceme získat DNA, je nutné vše mechanicky homogenizovat, aby se rozrušily tkáně, a promíchat, aby mohlo dojít k denaturaci a následnému vysrážení proteinů. Dalším krokem je centrifugace. Vzniklá vodní fáze obsahuje RNA a pod touto fází se vytvoří organická vrstva obsahující proteiny a kvalitní DNA, kterou je nutno dalšími kroky získat. Toho docílíme použitím kyselého fenolu. Postupným promýváním a centrifugací je získán roztok obsahující vodný roztok nukleové kyseliny, ale i stopy fenolu a chloroformu, které by mohly způsobit nežádoucí denaturaci enzymů používaných při další práci s nukleovou kyselinou. Čistá DNA je získána následnou precipitací alkoholem. Nejhojněji používaný je ethanol nebo isopropanol. Centrifugací je získán pelet sedimentující na dno zkumavky, který se naředí hydroxidem sodným a po další centrifugaci získáváme supernatant obsahující koncentrovaný roztok DNA. Koncentrace se pohybují nejčastěji mezi 500-1000 ng/μl, pro další použití je proto nutné roztoky zředit tkáňovou vodou. Vhodná koncentrace DNA pro polymerázovou řetězovou reakci a následně pro elektroforézu je 10 ng/μl [31, 34, 35].

Další často používanou metodou izolace DNA je užití proteinázy K, která rozrušuje tkáně. Zde není potřeba mechanického homogenizátoru. Lyzační pufr společně s proteinázou K je aplikován na živočišné tkáně. Ponechá se přes noc působit ve vodní lázni s teplotou 55°C. Následně je provedena centrifugace, precipitace v isopropanolu. Po další centrifugaci zůstává pelet čisté DNA na dně zkumavky, který se rozpustí v hydroxidu sodném [31, 34].

#### **2.4.2 Stanovení kvality a koncentrace DNA**

Pro další analýzy je nutné znát kvalitu a přesnou koncentraci izolované DNA. Měření koncentrace nukleových kyselin se provádí UV absorpční spektroskopií a je založeno na vlastnostech aromatické struktury bází, které absorbují záření o vlnové délce 260 nm. Množství absorbovaného UV záření je přímo úměrné množství DNA v měřeném vzorku, pokud je vzorek čistý, to znamená bez vyššího množství nečistot (bílkovin, zbytkového množství fenolu z izolace). Absorbance při vlnové délce 260 nm je rovna 1, pokud je v měřeném vzorku obsažena dvouvláknová DNA o koncentraci 50 μg/ml

nebo jednovláknová DNA o koncentraci přibližně 33 µg/ml. V případě RNA odpovídá absorpenci 1 koncentrace 40 µg/ml [33, 36, 37].

Spektrofotometrické měření koncentrace je založeno na zjištění útlumu záření, které prošlo vzorkem. Lambert-Beerův zákon, který má tvar

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

kde  $A$  je absorbance při známé použité vlnové délce,  $\varepsilon$  značí extinkční koeficient (experimentální zjištění  $\varepsilon$  pro dsDNA při  $\lambda = 260$  nm je  $0,02 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$ , pro ssDNA za stejných podmínek  $\varepsilon = 0,027 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  je délka dráhy paprsku [33, 38].

Měření absorpce UV záření lze využít i pro stanovení čistoty získané DNA. Poměr absorbance při 260 nm a 280 nm může být použit jako indikátor čistoty nukleové kyseliny. Například proteiny obsahující aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin mají maximum absorbance při 280 nm, což sníží poměr  $A_{260}/A_{280}$ . Pás absorbance proteinů ale zahrnuje i vlnové délky 260 nm. Pokud tedy bude DNA značně znečištěná proteiny, bude naměřena vyšší koncentrace DNA, než ve skutečnosti je, a získáme falešné výsledky. Vyšší naměřená absorbance při 230 nm indikuje kontaminanty obsahující peptidové vazby nebo aromatické části, jako je fenol nebo další organická činidla. Absorbance při 320 nm až 330 nm poukazují na přítomné částičky z kolonek, které se využívají v komerčních izolačních kitech. U čistého vzorku by měl být poměr  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ . Nižší hodnoty poměru znamenají kontaminaci vzorku DNA proteiny nebo reagensy použitými při izolaci [33, 37, 38].

Mezi výhody spektrofotometrického měření koncentrace a čistoty nukleových kyselin patří rychlost a nízké finanční náklady. Metoda je vhodná pro rutinní měření u zaběhlých postupů. Údaj o absorpenci nám ale neposkytuje žádné informace o integritě molekuly DNA, nelze tedy zjistit, zda při izolaci nedošlo k fragmentaci nukleových kyselin. Zjištění integrity lze provést gelovou elektroforézou nebo PCR reakcí, amplifikací úseku dlouhého 20-30 kb. V případě fragmentace bychom získali kratší produkty PCR. Velikost PCR produktů bychom zjistili opět gelovou elektroforézou [31, 33].

### 2.4.3 Izolace RNA

Izolace ribonukleových kyselin je vzhledem k nižší stabilitě molekul RNA náročnější. Proto jsou vyžadovány přísnější podmínky, které je nutno přesně dodržovat. Jedná se o práci na ledu, užití špiček s filtrem nebo užití vody zbavené ribonukleáz, které by RNA jinak degradovaly. Při izolaci se využívá metody fenol-chloroformové extrakce, která byla zmíněna v kapitole 2.4.1 Izolace DNA. Po aplikaci TRI reagentu, mechanické homogenizaci, precipitaci chloroformem, promíchání a centrifugaci se odebere vodná fáze obsahující ribonukleové kyseliny. Následuje pročištění ethanolem, další centrifugace a vlastní separace RNA, kterou je nutno provádět ve sterilním boxu [31, 34].

Molekula RNA hraje klíčovou roli v přenosu informace zakódované v genomu (DNA) do mnoha různých forem proteinů. Je to termodynamicky stabilní molekula, která se však rychle štěpí v přítomnosti téměř všudypřítomných enzymů RNáz. Výsledkem je, že kratší naštěpené fragmenty RNA se vyskytují ve vzorcích a mohou potenciálně ohrozit výsledky dalších aplikací, jako je genová exprese, RT-PCR nebo užití mikročipů. Aby bylo možné vyhodnotit stupeň degradace, používají se pro oddělení různě velkých fragmentů molekul RNA elektroforetické metody. Molekuly RNA jsou obarveny interkalačním fluorescenčním barvivem (ethidium bromidem) a detekovány pomocí laserem indukované fluorescence. Výsledky jsou zobrazeny na elektroferogramech, obrázcích gelu nebo v tabulkách [39].

#### 2.4.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce umožňuje poměrně snadné zmnožení vybraného úseku molekuly DNA in vitro. Jedná se o jednu z nejvíce využívaných metod genetické analýzy. Princip je založen na replikaci nukleových kyselin. Amplifikovaný úsek je ohraničen na obou svých koncích dvěma primery (18-25 nukleotidů), každý hybridizuje s jedním templátovým vláknem DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. Od těchto přisedlých primerů probíhá protisměrná syntéza nového řetězce DNA [40, 41].

Reakce nejčastěji využívá enzymovou aktivitu Taq-DNA-polymerázy, enzymu izolovaného z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých vodních pramenech a odolávající teplotám denaturace DNA. Reakce zahrnuje 3 opakující se kroky: denaturace templátového vlákna DNA, hybridizace primerů (annealing) a syntéza DNA. Tyto kroky probíhají v termocykleru, který je schopen změn teplot o desítky stupňů během několika sekund podle naprogramovaného časového intervalu. Zahájení reakce spočívá v úvodní denuraci templátu, která probíhá 3-5 minut za teploty 94-97 °C a potom až následují zmíněné tři opakující se kroky. Je nutno rozvolnit vodíkové můstky na celém úseku vlákna DNA. Pokud by nebyla úvodní denaturace (3-5 min) úplná, mohlo by dojít k renaturaci a k nespécifickému nasedání primerů. Při dalších cyklech už můžeme zvolit pro denuraci kratší dobu, protože je v reakci již přítomná templátová DNA vzniklá z prvního cyklu reakce. Budou se tedy denaturovat jen krátké úseky ohraničené primery [31, 40, 41].

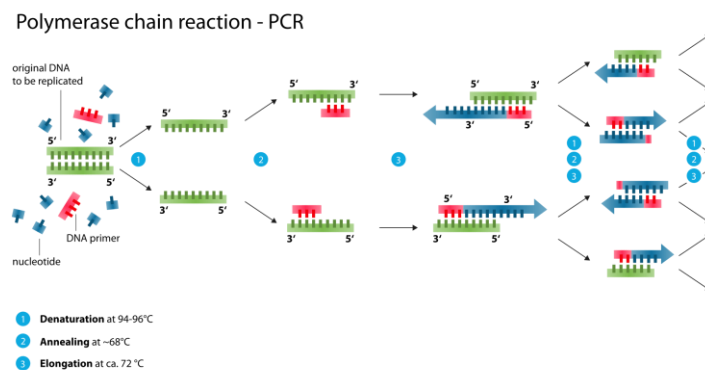
Při denuraci se teploty pohybují nejčastěji mezi 90-95 °C po dobu 20-30 sekund, dochází k porušení vodíkových vazeb spojující řetězce polynukleotidů. Ty se rozvolní a vzniknou dvě jednovláknové molekuly DNA. Pro nasednutí primerů se teplota snižuje na 40-60 °C v závislosti na délce a počtu GC párů použitých oligonukleotidů. Čím větší délka použitých primerů a čím více GC párů, tím vyšší teplotu k hybridizaci vyžadují. Další požadavky na primery jsou: rovnoměrné rozložení oblastí bohatých na GC a AT páry, podobná teplota annealingu vyšší než 50 °C, absence vnitřních sekundárních struktur a komplementárních sekvencí, kdy by se tvořily nežádoucí

duplexy, a specifičnost – matrice DNA nemůže obsahovat nesespecifická vazebná místa. Navržení primerů je možné pomocí některého ze softwarů volně dostupných na internetu. Ve druhém kroku se naváže primer na specifické úseky DNA. Komplementární úseky DNA/primer jsou rozpoznány DNA-polymerázou. Ve třetím kroku dochází k samotné syntéze DNA. DNA-polymeráza posouvá po templátovém vlákně ve směru od 5' konce ke 3' konci a podle templátového vlákna komplementárně dosyntetizovává nukleotidy rychlostí cca 60 bazí za sekundu. Optimální teploty se pohybují v rozmezí 70-75 °C pro PCR reakce, kde se používá Taq-polymeráza. Pro jiné druhy polymeráz se mohou teploty lišit podle optima jejich aktivity [31, 40, 41, 42].

Tyto 3 kroky se cyklicky opakují za přesné kontroly. Délka trvání každého cyklu je několik minut a každým cyklem se množství DNA zdvojnásobí. Z důvodu získání dostatečného množství produktu se cykly opakují 25-35krát. Po 30 cyklech je možné vytvořit až 130 milionů kopií původního vlákna DNA vymezeného primery. Pokud bychom zvolili více cyklů, vznikalo by nám i velké množství nežádoucích nesespecifických produktů PCR. Reakční směs používaná pro PCR reakci obsahuje kromě výše zmíněných primerů a DNA-polymerázy také hořčičnaté ionty  $Mg^{2+}$  a jednotlivé 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP – dATP, dCTP, dGTP a dTTP). Tyto dvě složky spolu tvoří rozpustný komplex, který je rozpoznáván DNA-polymerázou. Pro každou PCR reakci je nutno stanovit jejich optimální koncentraci. Schéma PCR je na obrázku 2.2 [31, 37, 40].

Výsledným produktem polymerázové řetězové reakce jsou úseky DNA s definovanou délkou desítky až tisíce párů bazí, amplikony. Úspěšné provedení reakce se prokáže elektroforetickou separací na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Další analýza může být provedena například pomocí hybridizací se značenou sondou, která je komplementární k amplifikovanému úseku, a enzymovou imunoanalytickou detekcí (ELISA) [31].

Mezi faktory, které mohou ovlivnit PCR, patří doba a teplota annealingu, která může zvýšit výtěžek reakce, ale může docházet i ke snížení specifity nasedání. Dalším faktorem je laboratorní teplota. DNA-polymeráza může katalyzovat prodlužování primerů i za nižší teploty, než je optimální teplota její aktivity. Vzniká nesespecifický produkt, zejména při nízkých koncentracích templátové DNA. Příliš vysoká koncentrace primerů vede k jejich nesespecifickému nasedání anebo ke vzájemnému párování. Nízká koncentrace primerů může být příčinou nedostatečného množství PCR produktu. Dalším faktorem ovlivňující vzniklý produkt je příliš velké počáteční množství templátové DNA, které může způsobit opět nesespecifické nasedání primerů. Výsledky reakce může ovlivnit i kontaminace jedinou molekulou cizorodé DNA, která může vytvořit falešný signál. Pro minimalizaci falešných výsledků je doporučeno přesně dodržovat určené postupy, používat jednorázové rukavice, špičky s filtry a řídit se doporučenými koncentracemi a teplotami [31, 42].



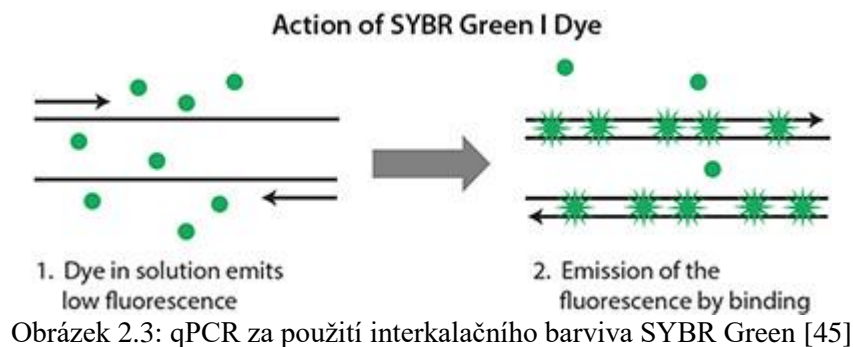
Obrázek 2.2: Průběh řetězové polymerázové reakce [43]

## Gen 16S rRNA

Izolace DNA poskytne celkovou DNA všech mikroorganismů nacházejících se ve vzorku. Pro zkoumání bakteriálních komunit se lze zaměřit na gen o délce cca 1550 bazí kódující 16S rRNA. Tento gen, důležitý pro tvorbu bílkovin, sdílejí všechny bakterie. Má několik konzervovaných a variabilních oblastí, které mohou být pro určité skupiny nebo druhy bakterií specifické. Univerzální primery se obvykle volí jako komplementární ke konzervovaným oblastem na začátku genu a buď v oblasti 540 bp nebo na konci celé sekvence. V případě další analýzy DGGE se používá sada primerů, z nichž jeden obsahuje dlouhou sekvenci bohatou na G-C páry. Sekvence 16S rRNA genu byla určena pro velké množství kmenů. GenBank, největší databanka nukleotidových sekvencí, má více než 90 000 sekvencí genu 16S rRNA. S těmito uloženými sekvencemi můžeme porovnávat námi získané neznámé sekvence. Obecně platí, že srovnání sekvencí genu 16S rRNA umožňuje diferenciaci mezi organismy na úrovni rodu napříč všemi hlavními kmeny bakterií. Gen 16S rRNA byl přijat jako klasifikační standard pro bakterie. Proto se metodou PCR amplifikuje [32, 44].

### 2.4.5 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR, jinak označovaná jako real-time PCR nebo qPCR je laboratorní technika pro měření koncentrace cílové sekvence DNA s vysokou přesností. Je založena na principu klasické PCR (kapitola 2.4.4 Polymerázová řetězová reakce). Kvantifikace je provedena na základě detekce fluorescenčního signálu, který je emitován během amplifikace značenými sondami nebo interkalačními látkami obsaženými v reakční směsi, které se specificky či nespecificky váží na amplikony DNA (obrázek 2.3). Mezi interkalační látky zařazujeme nespecificky se vážící ethidium bromid nebo často používaný SYBR Green. Tato barviva se vmezeřují mezi dvě vlákna DNA. Nevýhodou interkalačních barviv je možnost navázání se i na nespecifické produkty, tudíž může docházet k tvorbě falešných signálů, které přesahují signály skutečného množství produktu. Dále tato barviva emitují nízký signál fluorescence i v nenavázaném stavu [31, 32, 37].

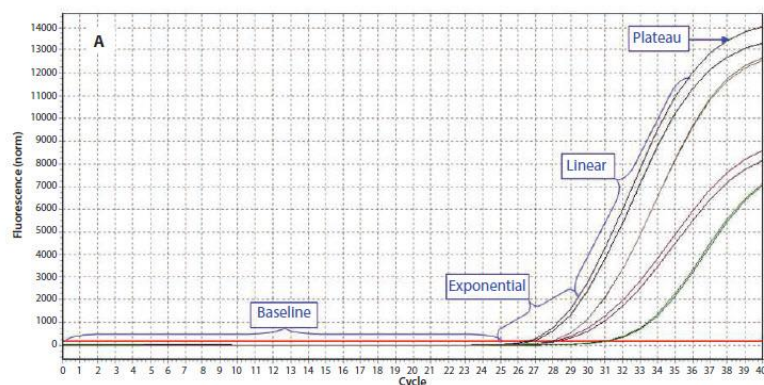


Použitím specificky se vážících sond tyto falešné signály eliminujeme. Sondy jsou krátké fluorescenčně značené oligonukleotidy, které emitují fluorescenční záření, pokud hybridizují s teplotou mezi primery. Každá molekula sondy má na jednom konci fluorescenční barvivo, na druhém konci je připojena sloučenina, která fluorescenční signál inhibuje. Hybridizací je vazba porušena a dochází ke generování fluorescenčního signálu. Použití sond označených různými fluorescenčními barvivy umožňuje současnou detekci a kvantifikaci více cílů v jedné (multiplexní) reakci [37].

Nespecifické produkty lze zjistit z křivky tání (melting curve), kterou lze zobrazit po proběhnutí reakce. Nespecifické produkty mají zřetelně nižší hodnotu tání než delší specifické amplikony. Ani toto zobrazení není plně prokazatelné, protože amplikony délkou podobné, ale neidentické, mají teplotu tání podobnou specifickým [31, 32, 37].

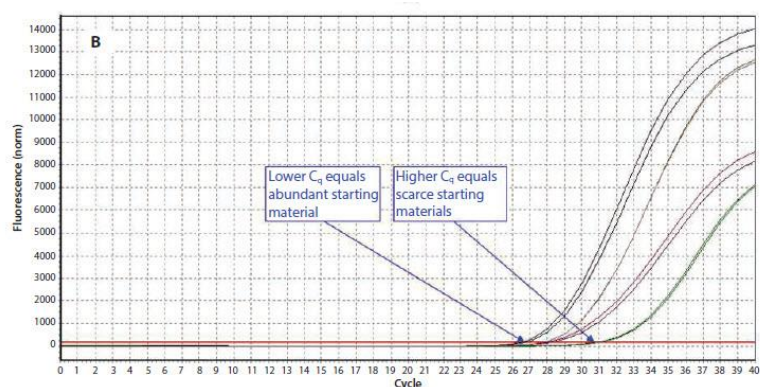
Světelná fluorescence je přístrojem zachycena za předpokladu překročení prahové hodnoty. Zvýšení fluorescenčního signálu je přímo úměrné množství exponenciálně se hromadících molekul PCR produktu (amplikonů) produkovaných během opakujících se fází reakce (viz kapitola 2.4.4 Polymerázová řetězová reakce) Počet cyklů potřebných k vytvoření detekovatelného signálu získáme extrapolací vzniklé křivky k nule. Hodnota značící se  $C_t$  (počet cyklů) je závislá na počáteční koncentraci templátu. Pro nižší počet cyklů platí vyšší počáteční koncentrace templátové DNA. Křivka závislosti signálu fluorescence na počtu cyklů  $C_t$  na obrázku číslo 2.4. Vznikající množství produktu qPCR lze kvantifikovat porovnáním s různě naředěnými standardy o známé počáteční koncentraci, nebo porovnáním s kalibrační přímkou, pokud využijeme známé množství DNA [31, 32].

Průběh reakce qPCR je možné rozdělit do čtyř fází (obrázek 2.4). V takzvané „baseline“ fázi dochází k exponenciálnímu nárůstu množství templátové DNA, ale emitovaný fluorescenční signál ještě nedosáhl prahové hodnoty detekce. Detektorem snímaná intenzita fluorescence je signál na pozadí. Při exponenciální fázi dosáhl výtěžek prahové hodnoty detekce, proto může být průběh reakce již sledován. Neustále dochází k exponenciálnímu nárůstu PCR produktu. Postupně se zvyšuje koncentrace templátu, lineární růst. Poslední fáze, „plateau,“ maximální výtěžek reakce. Může dojít ke spotřebování jednotlivých složek reakce (nukleotidy, polymeráza) a detekovaná fluorescence z této fáze nemusí odpovídat reálnému množství templátové DNA [46, 37].



Obrázek 2.4: Průběh reakce qPCR [46]

Jednotlivé reakce jsou charakterizovány cyklem, při němž nejprve vzroste fluorescence nad prahovou hodnotu, která se nazývá kvantifikační cyklus ( $C_q$ ). Pokud je výchozí koncentrace DNA vysoká, pozoruje se amplifikace v dřívějších cyklech a  $C_q$  je nižší. Pokud je výchozí koncentrace DNA, amplifikace je pozorována v pozdějších cyklech a  $C_q$  je vyšší (obrázek 2.5) [46].



Obrázek 2.5: Průběh reakce qPCR, kvantifikační cyklus [46]

## 2.4.6 Purifikace nukleových kyselin

Přečištění nukleových kyselin zahrnuje odstranění veškerých nežádoucích složek, které vzorek kontaminují. Purifikace je součástí procesu izolace DNA nebo RNA, přečišťování produktů PCR reakce nebo přečišťování DNA po elektroforetické separaci. Často se využívá komerčně dostupných purifikačních sad (kitů) pracujících na základě gravitačních kolonek. Principem je zachycení molekul nukleových kyselin na vhodný nosič v kolonce, následné opakování odstředění a promývání, čímž dochází k odmytí nežádoucích molekul. Posledním krokem je uvolnění nukleových kyselin z nosiče za použití jiného pufru nebo vody. Výsledným produktem je roztok čisté nukleové kyseliny [31, 47].



## 2.4.7 Elektroforetické separace nukleových kyselin

K nejpoužívanějším molekulárně biologickým separačním technikám při analýze nukleových kyselin nebo bílkovin můžeme zařadit elektroforetickou separaci. Jedná se o metodu, při které dochází k migraci elektricky nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli. Fosfátová skupina molekul nukleových kyselin je záporně nabitá, proto se v elektrickém poli pohybuje k anodě, kladně nabité elektrodě. Rychlost migrace molekuly závisí na dvou faktorech – jejich tvaru a poměru náboje k hmotnosti [31].

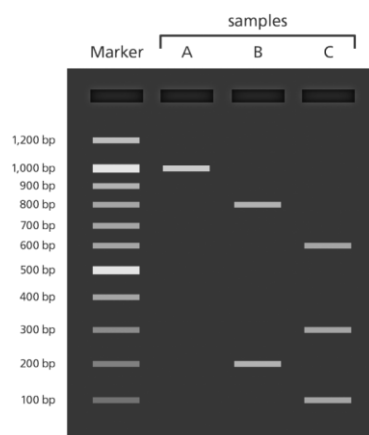
### Gelová elektroforéza

Pokud se elektroforéza provádí v gelu, je hlavním faktorem separace velikost jednotlivých fragmentů DNA. PCR směs obsahující namnožené fragmenty se nanese do startovacích jamek na vhodném nosiči, kterým může být agarózový, polyakrylamidový gel nebo jejich směs. Gely vytvářejí komplexní síť pórů, skrz které budou fragmenty DNA migrovat. Do jednoho nebo více žlábků se aplikuje standard (marker) obsahující fragmenty známé délky, která byla stanovená sekvenováním. Přibližnou velikost separovaných neznámých částí DNA lze proto určit jejich porovnáním se standardy. Po zapnutí elektrického pole se začnou záporně nabitě fragmenty DNA pohybovat k anodě. Jakou rychlostí migrují, závisí na velikosti dané molekuly. Větší fragmenty se pohybují póry v gelu pomaleji než fragmenty malé, proto dojde k jejich rozdělení podle velikosti. Separace molekul je také ovlivněna jejich konformací. Méně spiralizovaná DNA migruje v gelu pomaleji než superspiralizovaná DNA, která prochází gelovou strukturou snadněji. Je možné tak odlišit kovalentně uzavřené cyklické molekuly, otevřené cyklické molekuly a lineární molekuly. Relativní pohyblivost těchto forem molekul je závislá na podmínkách elektroforézy [31, 37, 48, 49].

Následná identifikace separovaných molekul, které nejsou okem viditelné, se provádí obarvením vhodným barvivem a následným vystavením UV záření. Jedním ze způsobů barvení je ponořit gel do roztoku obsahující barvivo. Jako barvivo se často používá ethidium bromid (EtBr), který se na DNA naváže a při osvětlení UV zářením fluoreskuje. Molekuly DNA jsou na gelu viditelné jako proužky v případě, že je jejich koncentrace dostatečná (obrázek 2.6). Intenzita fluorescence úseků (bandů) je přímo úměrná koncentraci DNA. Pokud úsek obsahuje méně než 10 ng DNA, nemusí být při vystavení UV záření viditelný. EtBr se přidává do samotného gelu i do pufru, ve kterém je gel ponořen. Je ale nutné s ním pracovat opatrně a rychle, neboť má silné mutagenní účinky. Vmezeřuje se mezi sousední páry bazí do molekul DNA, což způsobuje částečné odvíjení dvojitřroubovice DNA [31, 37, 48].

Elektroforetické gely jsou nejčastěji složeny z agarózy nebo polyakrylamidu. Tyto složky vytvářejí síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Velikost pórů můžeme ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymerní látky, vyšší koncentrace gelu zajišťuje lepší separaci kratších fragmentů. Pro separaci molekul nukleových kyselin

velikosti 100 pb-50 kb jsou vhodné agarózové gely. Pro separaci menších molekul 10 pb až 1 kb se používají polyakrylamidové gely s malými póry [31, 50].

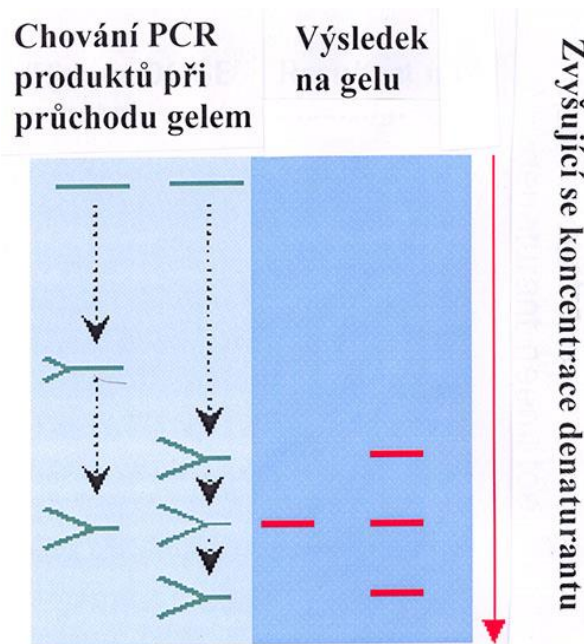


Obrázek 2.6: Ilustrace separovaných fragmentů DNA na gelu, velikost jednotlivých fragmentů se určuje podle markeru obsahujícího fragmenty o známé délce [51]

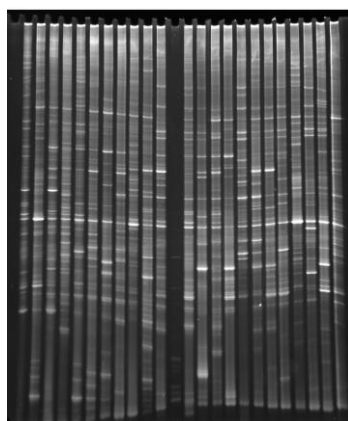
### Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

DGGE se využívá pro analýzu rozmanitosti mikrobiálních společenstev na základě primární struktury (sekvence) DNA. V PCR namnožené fragmenty DNA, gen 16S rRNA, jsou oddělovány v polyakrylamidovém gelu obsahujícím denaturační gradient. Ten se vytvoří při nalévání gelu do svislé formy, kde koncentrace denaturačního činidla (formamidu nebo močoviny) lineárně vzrůstá. Separace fragmentů DNA probíhá na základě částečného rozpletení dvoušroubovice DNA (obrázek 2.7). Heteroduplexy namnožených ampliconů 16S rRNA se díky různému obsahu G-C párů rozdílně denaturují, vytvářejí rozvětvené struktury obsahující jednořetězcové oblasti. Elektroforetická mobilita závisí na sekvenci fragmentu. Vyšší výskyt G-C párů, tedy vyšší počet pevnějších trojitých vodíkových můstků zpomaluje denaturaci. Amplicony se během DGGE pohybují gradientem formamidu a močoviny, dokud nedosáhnou kritické denaturační koncentrace. V tomto okamžiku se normálně lineární amplicony více podobají globulárním proteinům [31, 52, 53].

Výsledkem DGGE je elektroforetický profil mikrobiomu přítomného ve vzorku (obrázek 2.8). Každý vodorovný pás úseků (bandů) představuje jeden druh bakterie. Po elektroforéze jsou migrované amplicony uvnitř polyakrylamidového gelu barveny ethidium bromidem, barvivem SYBR Green nebo dusičnanem stříbrným [32].



Obrázek 2.7: DGGE [54]



Obrázek 2.8: DGGE gel

### Kapilární gelová elektroforéza

Kapilární gelová elektroforéza se používá pro stanovení délky jednořetězcových oligonukleotidů DNA, které byly získány sekvenováním. Pohyblivost těchto fragmentů musí záviset pouze na jejich délce, proto je nutné zabránit vytváření dvouřetězcových fragmentů, které by tuto separaci negativně ovlivňovaly. Z tohoto důvodu elektroforéza probíhá za teplot 50-60 °C a gel obsahuje vyšší koncentrace denaturujících látek (močovina). Migrující fragmenty DNA jsou udržovány v denaturovaném stavu a v případě Sangerova sekvenování putují gelem (podle velikosti od nejkratšího po nejdelší) k laserovému svazku a detektoru emitovaného fluorescenčního záření [31, 33].

## 2.4.8 Sekvenování nukleových kyselin

Sekvenování je proces určení primární struktury nukleových kyselin, tedy přesné pořadí nukleotidů (A, G, C, T) v řetězci DNA. V dnešní době jsou již známy kompletní nebo téměř kompletní sekvence celých genomů u více než 2000 virů, 700 bakterií a archeí. Dále známe sekvenci u 99 % euchromatinu lidského genomu. Stanovení přesné sekvence DNA je klíčové pro další analýzu genomů, zjištění mutací nebo pro urychlení dalších molekulárně biologických metod, např. polymerázové řetězové reakce (kapitola 2.4.4), kdy je možné rychleji určit potřebné sekvence primerů [31, 55].

Pro studium bakteriální diverzity je tradičně využíván gen 16S rRNA, který má dostatečnou variabilitu ke zjištění fylogenetických rozdílů a má dostatek konzervovaných oblastí, které mohou být amplifikovány. V současné době existuje několik postupů pro sekvenování DNA, mezi nejpoužívanější patří Sangerovo sekvenování (enzymová metoda) a neustále se rozvíjející Sekvenování nové generace (NGS). Všechny metody lze rozdělit do dvou hlavních kategorií založených na sekvenování: (1.) užití klonových knihoven a (2.) přímé sekvenování [32, 37, 56].

Analýza knihoven klonovaných genů 16s rRNA je tradiční metoda založená na sekvenování. Tato metoda poskytuje informace o struktuře bakteriální komunity ve střevech. Primery jsou využity k amplifikaci univerzálního genu, který se vyskytuje napříč všemi členy daných komunit. Amplikony jsou následně ligovány (integrovány) do bakteriálních plazmidů elektroporací (vytvoření pórů pomocí elektrického impulsu, do hostitelské buňky lze vpravit cizí genetický materiál) nebo teplotním šokem (42 °C), který zajistí vtažení plasmidové DNA do buňky. Dalším krokem je Sangerovo sekvenování. Každý buněčný klon bude obsahovat jeden vložený amplikon představující jediného jednotlivce z komunity. Další výhodou je možnost snadného provedení úplného sekvenování genu 16S rRNA (všech 9 variabilních oblastí), což umožňuje zjistit fylogenetické zařazení [32, 57].

Metagenomika, hromadná studie všech genomů v jedné komunitě, zahrnuje přímé sekvenování, které umožňuje charakterizaci bakteriálních komunit bez klonování. V současné době existují čtyři primární dodavatelé sekvenačních platform nové generace (NGS sekvenování): (1.) 454 Life Sciences, (2.) Illumina, Inc., (3.) Applied Biosystems a (4.) Life Technologies. Systémy se liší v sekvenační biochemii. Dále se v kapitole 2.4.8 Sekvenování nukleových kyselin budu věnovat platformě Life Technologies, která byla použita v praktické části této diplomové práce [32].

### Sangerovo sekvenování

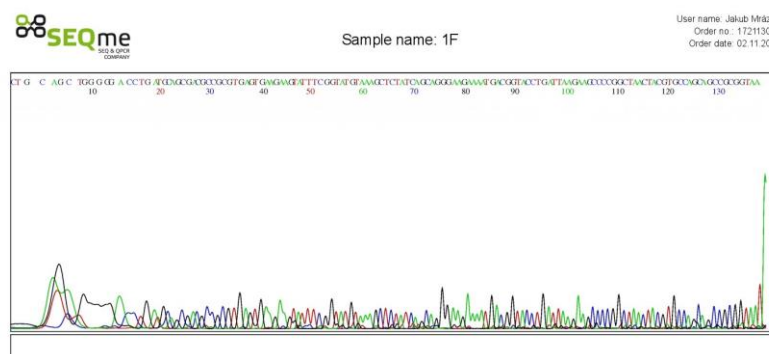
Sekvenování pojmenované podle svého autora Frederica Sangera je založeno na principu vytvoření jednovláčkové DNA (ssDNA). Velikost molekul se od sebe liší pouze jedním nukleotidem, je tedy možné je následně separovat elektroforézou na polyakrylamidovém gelu nebo kapilární elektroforézou. Základní podmínkou pro začátek reakce je vytvoření

molekul DNA s přesně známými konci, proto se nejčastěji používají produkty získané z PCR [37, 31].

Prvním krokem je příprava již zmíněných jednořetězcových molekul DNA. Na identická místa každé molekuly DNA, je navázán krátký oligonukleotid. Tento oligonukleotid bude následně působit jako primer pro syntézu nového komplementárního řetězce DNA. Syntetická reakce je katalyzována enzymem DNA polymeráza a vyžaduje, stejně jako u PCR reakce, čtyři deoxyribonukleotidfosfáty (dNTP – dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Dále se reakce účastní (zpravidla v poměru 1:100) i fluorescenčně značené dideoxynukleotidfosfáty (ddNTP – ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), které postrádají -OH skupinu na 3' konci, potřebnou k vytvoření další vazby s dalším nukleotidem. Blokují tedy další prodlužování řetězce a působí jako terminátor syntézy DNA. Každý z ddNTP nese jiný fluorescenční marker. DNA polymeráza nerozlišuje mezi deoxy – a dideoxynukleotidfosfáty. Ty jsou podle pravidel o párování bazí syntetizovány do rostoucího řetězce. Z důvodu vyššího množství dNTP než ddNTP vzniká soubor fragmentů, které končí v různých vzdálenostech od původního primeru [31, 37, 55].

Výsledkem je soubor nově syntetizovaných molekul DNA různé délky a všechny jsou zakončené fluorescenčně značeným dideoxynukleotidem, jehož identita určuje povahu nukleotidu přítomného v ekvivalentní pozici v templátovém řetězci DNA. Identifikace koncového dideoxynukleotidu probíhá separací PCR produktů podle jejich délky na kapilární nebo polyakrylamidové gelové elektroforéze. Po oddělení je detekovaná fluorescence jednotlivých terminačních značek [31, 37].

Reakce se provádí současně ve čtyřech oddělených vzorcích. Každý vzorek obsahuje tři normální oligonukleotidy a jeden terminační, fluorescenčně značený. V každé reakci jsou tedy všechny PCR produkty zakončeny jen jedním typem ddNTP. Produkty jednotlivých reakcí se po skončení syntézy smíchají do jednoho vzorku a po denuraci jsou nanášeny do dráhy automatizované kapilární elektroforézy, aby mohla proběhnout jejich separace na základě délky. Vizualizace se provádí detekcí vlnové délky emitované fluorescenčně značeným ddNTP. Z pořadí detekovaných signálů je sestavena sekvence DNA. Na obrázku 2.9 je zobrazen počítačový výstup nukleotidové sekvence [37, 55, 31].



Obrázek 2.9: Elektroforegram, počítačový výstup nukleotidové sekvence

## Sekvenování nové generace

Metody sekvenování nové generace poskytují rychlé a přesné informace o genomech. Výhodou těchto postupů je schopnost produkce velkého množství dat za relativně krátkou dobu a nízkou cenu. Na trhu je nyní dostupných více komerčních platforem, které používají různé sekvenční technologie, proto je možné pro konkrétní aplikace vybírat tu nejvýhodnější. Všechny dostupné metody zahrnují několik kroků: izolace DNA, polymerázová řetězová reakce, příprava knihoven, příprava templátů, sekvenování a analýza dat [58, 59].

Ve zpracování praktické části byla použita platforma Life Technologies (Ion Torrent) založená na detekci vodíkových iontů, které se uvolňují během polymerace DNA. Při polymeraci je vytvořen komplementární řetězec k templátovému vláknu.

Součástí sekvenátoru je křemíkový polovodičový čip s mikroskopickými jamkami, ve kterých je imobilizována templátová DNA. Jamky jsou na iontově senzitivní vrstvě, pod níž je iontový senzor (ISFET). Jamky jsou postupně zaplaveny směsí DNA polymerázy a jednotlivými deoxyribonukleotidtrifosfáty. V případě, že je daný deoxyribonukleotidtrifosfát komplementární k templátovému vláknu, dojde k jeho navázání do rostoucího řetězce, což způsobí uvolnění vodíkového iontu a změnu pH. Změna pH je detekována čipem jako změna signálu. V případě, že nukleotid není k rostoucímu řetězci komplementární, nepřipojí se a nedochází k žádné změně napětí. Následně jsou volné nukleotidy odmyty a je aplikován další typ deoxyribonukleotidtrifosfátu. Po ukončení sekvenace se elektrické impulsy zaznamenané čipem do počítače převedou na sekvence DNA [60, 61].

## 2.5 Cíle práce a hypotézy

Cílem této práce je seznámit se s metodikou a vypracovat literární rešerši o vztahu obezity a mikrobiomu trávicího traktu (TT) a o způsobech popisu mikrobiomu trávicího traktu.

Dalším cílem je seznámení se s přístrojovým vybavením, které je nutné pro ovládnutí molekulárně genetických metod, a tyto metody prakticky zvládnout. Jedná se o metody izolace DNA a RNA, amplifikace vybraných genů metodou PCR, kvantifikace mikroorganismů použitím real-time PCR, elektroforetické techniky jako je agarózová a gelová elektroforéza v denaturačním gradientu (DGGE) a sekvenování nukleových kyselin, včetně provedení statistického vyhodnocení.

S použitím výše uvedených metod pak srovnáme mikrobiom trávicího traktu obézních a kontrolních myší za různých výživových podmínek.

### Hypotézy

- Potravinové doplňky zlepšují parametry obezity.
- Potravinové doplňky podávané myším s vysokotukovou dietou změní mikrobiom směrem k mikrobiomu myší se standardní tělesnou hmotností.



## 3 Metody

### 3.1 Myší model

Souvislost mezi obezitou a střevní mikroflórou byla původně zjištěna na základě studií u myši bez zárodků mikrobiot. Tyto myši jsou chovány pro experimentální účely, jsou na svět přivedeny sterilním císařským řezem, poté se umisťují do sterilního prostředí a je jim podávána sterilizovaná potrava. Jejich tělo tedy neosidlují žádné mikroorganismy, myši pomalu rostou a poměrně často trpí defekty, při kontaktu s vnějším nesterilizovaným prostředím brzy hynou [2, 62].

Mezi všemi druhy zvířat byla právě laboratorní myš nápomocná při modelování lidské biologie a chorobných stavů. Dostupnost rozsáhlých informací o genetice myši, použití inbredních buněčných linií a rozvoj molekulární biologie učinily z geneticky modifikovaných myších modelů cenný nástroj pro pochopení biologických funkcí. Dále se knockout myši (myši se záměrně inaktivovanými geny) využívají i při vývoji nových léčiv [63].

Konzervativně chované myši mají o 40 % vyšší obsah tělesného tuku a o 47 % vyšší obsah tuku v gonádách než gnotobiotické myši, ačkoli konzumují méně potravy. Když byla transplantována distální střevní mikrobiota od standardních myši gnotobiotickým myším, byl sledován nárůst tělesného tuku během dvou týdnů o 60 % bez jakéhokoli zvýšení spotřeby potravy nebo zjevných rozdílů v energetickém výdeji. To naznačuje, že střevní mikrobiota ovlivňuje fenotypové charakteristiky hostitele spojené s obezitou [2].

Pro experiment prováděný v laboratoři Biologie tukové tkáně na Fyziologickém ústavu AV ČR byly použity myši C57BL/6N (B6), ideální také pro výzkum dietou vyvolané obezity (obrázek 3.1). Dále kmen vykazuje zvýšenou preferenci alkoholu a narkotik, proto je využíván i ke genetickým studiím zneužívání návykových látek. Kmen C57BL/6 je použit jako základ rozsáhlých genomových knihoven [63].

Černě zbarvení samci ve věku 10 týdnů byli zakoupeni od Charles River Laboratories (Sulzfeld, Německo). Byli udržováni po dobu dvou týdnů v pravidelném dvanáctihodinovém cyklu světlo (od 6:00 hod) / tma při teplotě 22 °C. Zvířata měla neustálý přístup k vodě a k nízkotučné potravě. Ve věku dvanácti týdnů byly myši převedeny na experimentální výživu, jejíž součástí byly i metabolické in vivo testy. Během testů byla monitorována tělesná hmotnost myši. Čerstvá potrava byla podávána každé dva dny. Výpočet průměrného energetického příjmu byl založen na měření spotřeby potravy během 24 hodin, které bylo hodnoceno pro jednotlivé myši jedenkrát týdně.

Na konci experimentu, po 8 týdnech podávání experimentálních diet, byly myši usmrceny cervikální dislokací v diethyletherové anestezii, byla odebrána krev

z cervikálního řezu. Myši a vybrané vypreparované tkáně byly zváženy, tkáně následně zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro následné biochemické analýzy. Všechny pokusy na zvířatech byly schváleny Etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd (schvalovací číslo 127/2013).



Obrázek 3.1: Myší model, kmen C57BL/6 [64]

### 3.1.1 Experimentální diety

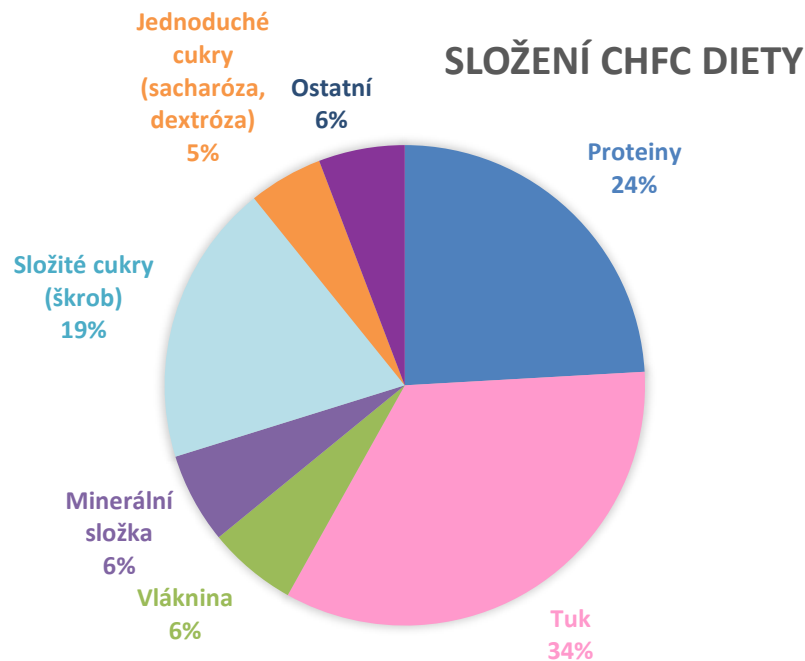
Diety byly myším podávány v laboratoři Biologie tukové tkáně na Fyziologickém ústavu AV ČR pod vedením MUDr. Martina Rossmeisla Ph.D. a Mgr. Olgy Horákové, Ph.D. Zde byly i odebrány vzorky, jejichž analýza probíhala na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Laboratoři anaerobní mikrobiologie pod vedením Ing. Jakuba Mrázka, Ph. D.

Kontrolní myši se standardní hmotností (STD) byly krmeny standardní stravou s nízkým obsahem tuku založenou především na sacharidech (pšeničný škrob – 100 % celulózy), bílkovinách a na vláknině.

V experimentu bylo použito 6 různých diet: výše zmíněná standardní nízkotuková dieta (STD), dále vysokotuková cHFc dieta, cHFc-F, Krill-H, Krill-L a Cal-L. Potravinové doplňky, omega-3 mastné kyseliny (EPA a DHA získané z mořských živočichů) snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění a mohou zlepšit patologické stavy spojené s obezitou. Podle studie [65] bylo v případě podávání doplňků ve formě fosfolipidů dosaženo silnějších biologických účinků ve srovnání s triglyceridovou formou a u obezních myši s přísávkou EPA/DHA k vysokotukové dietě byl sledován nižší hmotnostní přírůstek. Složení všech diet je znázorněno na obrázku 3.4.

#### Dieta cHFc

Pro vyvolání obezity a některých symptomů metabolického syndromu byla použita obezogení dieta s 33% obsahem lipidů. U vysokotukové diety označené jako cHFc (corn oil high-fat diet) zastupoval hlavní složku lipidů kukuřičný olej bohatý na omega-6 nenasycené mastné kyseliny (mastné kyseliny se dvěma a více dvojitými vazbami v uhlíkovém řetězci). Součástí jsou i esenciální mastné kyseliny, vláknina, Sunar, minerály, bílkoviny a kukuřičný škrob. Celková energetická hodnota je 21,4 MJ/kg. Složení diety je znázorněno na grafu na obrázku 3.3.



Obrázek 3.2: Graf složení vysokotukové cHFc diety, ze které vycházejí další druhy v experimentu použitých diet

### **Dieta cHFc-F**

V dietě cHFc bylo nahrazeno 15 % lipidů koncentrátem omega-3 mastných kyselin z mořských ryb, Epax® 1050 TG (EPAX AS, Norsko). Jedná se o vysoce koncentrovaný triglyceridový olej získaný z mořských ryb, který obsahuje přibližně 60 % EPA (kyselina eikosapentaenová) + DHA (kyselina dokosahexaenová), tj. 32,5 g EPA/DHA na 1 kg stravy [66].

### **Dieta Krill-H**

Dieta cHFc je doplněná o vyšší dávku oleje z krillu (Rimfrost USA, Avoca Farm Road, Merry Hill, NC, USA), která odpovídá obsahu EPA + DHA při dietě cHFc-F, tedy 32,5 g EPA/DHA na 1 kg stravy. Krill je bohatý jak na EPA, tak na DHA ve fosfolipidových mastných kyselinách, na rozdíl od rybího oleje, kde jsou obě kyseliny obsaženy převážně v triglyceridech. Fosfolipidy jsou více amfifilní (mají lipofilní i hydrofilní vlastnosti) a mají tedy emulgační vlastnosti, které mohou přispět ke zvýšené absorpci [66].

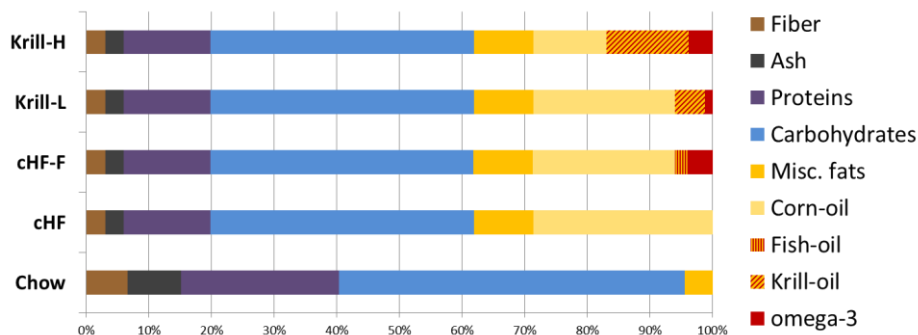
### **Dieta Krill-L**

Dieta cHFc doplněná nižší dávkou oleje z krillu stejného množství jako složky Epax® 1050 TG (52,5 g), kde EPA + DHA odpovídají obsahu 1/3 u diety cHFc-F, tj. 10,8 g EPA/DHA na 1 kg stravy.

### **Dieta Cal-L**

Dieta cHFc doplněná nízkou dávkou oleje Calanus (Calanus AS, Stakkevollvegen65, N-9010, Tromso, Norway), která odpovídá množství Epax® 1050 TG z diety cHFc-F

(52,5 g). Olej je extrahován ze zooplanktonu *Calanus finmarchicus*, nejhojnějšího korýše v severním Atlantském oceánu, a ve studiích byl používán na snížení tělesní hmotnosti u dietou vyvolané obezity u myši [67].

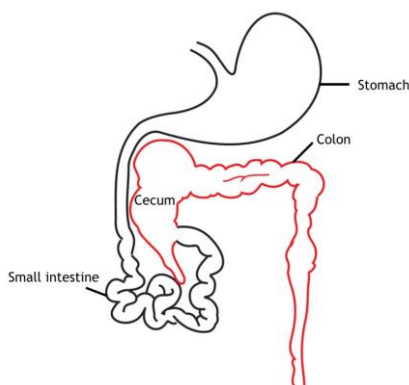


Obrázek 3.3: Složení diet použitých v experimentu. Chow = STD [79]

## 3.2 Sběr vzorků

U myši byl odebrán materiál z horní části slepého střeva (caecum), které je důležitým místem pro fermentaci rostlinných vláken, stejně jako pro produkci vitamínu K a B [12], a z tlustého střeva (colon), obrázek 3.5. Vzorky byly dodány z laboratoře Biologie tukové tkáně na Fyziologickém ústavu AV ČR. Následná analýza byla provedena na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Laboratoři anaerobní mikrobiologie pod vedením Ing. Jakuba Mrázka, Ph. D.

Celkový počet myších modelů byl 48. Z každé myši byly pro další analýzu odebrány dva vzorky – materiál z colonu a caeca, celkový počet vzorků byl 95, jeden vzorek colonu byl při odběru pravděpodobně znehodnocen. Myši byly rozděleny podle diety do 6 skupin po 8 zvířatech, každému vzorku bylo přiřazeno identifikační číslo 1-48 a kód "col" nebo "cae". Rozdělení do skupin je zadáno do tabulky 3.1.



Obrázek 3.4: Trávicí trakt myši, upraveno [68]

Tabulka 3.1: Rozdělení vzorků do skupin podle diet

Dieta	Colon	Caecum
cHFc	8 vzorků	8 vzorků
cHFc-F	7 vzorků	8 vzorků
Krill-H	8 vzorků	8 vzorků
Krill-L	8 vzorků	8 vzorků
Cal-L	8 vzorků	8 vzorků
STD	8 vzorků	8 vzorků
Celkem	95 vzorků	

### 3.3 Izolace DNA

Mikrobiální DNA byla izolována pomocí komerční soupravy (kitu) QIAamp® PowerFecal® DNA Kit (obrázek 3.6). Postupovali jsme přesně podle výrobcem přiloženého manuálu ze srpna 2016. Doporučená hmotnost jednoho původního fekálního vzorku je 0,25 g. Každý vzorek se homogenizuje ve zkumavce o objemu 2 ml, která obsahuje granátové kuličky. Rozbití buněk bylo realizováno na přístroji FastPrep (MP Bio) při rychlostech 6,5 m/s po dobu 30 sekund. Buněčnou lýzu provádí mechanické srážky kuliček a chemické narušení buněčných membrán. Technologie IRT (Inhibitor Removal Technology®) se používá pro odstranění nežádoucích látek obsažených ve vzorcích stolice, jako jsou polysacharidy, hemové sloučeniny a žlučové soli. Celková genomová DNA je po provedení centrifugace zachycena na membráně z oxidu křemičitého. Po promytí a eluci z membrány je DNA připravena na další analýzy. Tabulka 3.2 uvádí reagentie použité při izolaci DNA a jejich složení, které se podařilo dohledat. Kompletní složení všech roztoků výrobce neuvádí [69].

#### Reagentie

Tabulka 3.2: Reagentie použité pro izolaci DNA (QIAamp® PowerFecal® DNA Kit)

Reagentie	Složky
PowerBead solution	Součástí je guanidinium thiocyanate (% w/w = 1–10), chaotropní a silné denaturační činidlo.
C1 Solution	Součástí je dodecylsírán (% w/w = 1–10), detergent denaturující bílkoviny, narušuje buněčné stěny.
C2 Solution	neuveďeno
C3 Solution	neuveďeno
C4 Solution	Součástí je guanidine hydrochloride (% w/w = 50-70), silné chaotropní činidlo, a isopropylalkohol (% w/w = 1–10).
C5 Solution	Obsahuje ethanol (% w/w = 50-70).
C6 Solution	10 mM Tris.

## Postup

Vzorek o hmotnosti cca 0,25 g jsme vložili do zkumavky s granátovými kuličkami Dry Bead Tube a přidali 750  $\mu\text{l}$  PowerBead Solution, 60  $\mu\text{l}$  Solution C1 a každý vzorek homogenizovali vortexováním. Solution C1 obsahuje dodecylsírán sodný podporující lýzu buněk a je aniontovým detergentem, jenž rozkládá mastné kyseliny a lipidy v buněčné membráně. Dále jsme vzorky 10 minut ohřívali ve vodní lázni o teplotě 65 °C, což urychlilo reakce rozkladu buněk stolice.

Následovalo horizontální vortexování v přístroji MP-FastPrep®-24. Zvolili jsme program 4, zahrnující 3 cykly: 1 minuta vortexování a 5 minut pauza. Mechanickým protřepáváním došlo k úplné homogenizaci vzorku a chemických činidel.

Všechny vzorky byly následně centrifugovány rychlostí 12000 rpm po dobu 90 sekund za pokojové teploty. Do nových eppendorfek jsme přidali 250  $\mu\text{l}$  Solution C2, jenž má výše zmíněnou technologii IRT, a supernatant vzniklý centrifugací, směs lehce homogenizovali vortexováním a 5 minut chladili (2–8 °C). Při tomto kroku dochází k vysrážení organického i anorganického materiálu neobsahujícího DNA, který by mohl snížit čistotu DNA. Tyto vysrážené složky se při následné centrifugaci (12000 rpm 90 sekund) usadí na dno zkumavek.

Do další sady eppendorfek jsme přidali 200  $\mu\text{l}$  Solution C3 a vzniklý supernatant (cca 600  $\mu\text{l}$ ), aniž by došlo ke kontaktu se sedimentem. Směs jsme opět homogenizovali vortexováním a zchladili (2-8 °C, 5 minut). Solution C3 má rovněž technologii IRT a je druhým činidlem zajišťujícím vysrážení anorganických a organických složek neobsahující DNA. Jejich odstranění je pro další využití DNA klíčové. Po opětovné centrifugaci (12000 rpm 90 sekund) jsme vzniklý supernatant (max. 700  $\mu\text{l}$ ) přenesli do nových eppendorfek s 1200  $\mu\text{l}$  Solution C4 a směs homogenizovali. Solution C4 je vysoce koncentrovaný roztok solí a DNA se při vysokých koncentracích solí snadno váže na oxid křemičitý na membráně.

Do kolonek MB Spin Column jsme přenesli 650  $\mu\text{l}$  supernatantu a centrifugovali (12000 rpm, 90 s, 20 °C). Odlili jsme tekutinu ze spodní části kolony. Celý krok jsme 3x opakovali. DNA se navázala na membránu, zatímco kontaminanty prošly.

Do kolony s navázanou DNA jsme přidali 500  $\mu\text{l}$  Solution C5 a centrifugovali (12000 rpm, 90 s, 20 °C). Promývací roztok C5 na bázi ethanolu se používá k dalšímu čištění DNA a k odstranění zbytkových solí a dalších kontaminant. Tekutinu ze spodní části kolony jsme opět vylili a provedli centrifugaci prázdné kolony (12000 rpm, 90 s, 20 °C), aby byly odstředěny zbytky ethanolového roztoku C5.

Vrchní část kolony s membránou jsme umístili do čistých eppendorfek a přidali 100  $\mu\text{l}$  Solution C6 do centra filtrační membrány, došlo k uvolnění DNA z membrány. Při centrifugaci (12000 rpm, 90 s, 20 °C) uvolněná DNA s 10 mM Tris prochází membránou do zkumavky Eppendorf [69].



Obrázek 3.5: QIAamp® PowerFecal® DNA Kit

Na NanoDropu One<sup>c</sup> jsme změřili koncentraci získané DNA a hodnoty zaznamenali. Všechna DNA byla naředěna sterilní dH<sub>2</sub>O na koncentraci 20 ng/μl podle vzorce (2):

$$d = \frac{x \cdot y}{z} \quad (2)$$

kde  $d$  je množství koncentrované DNA,  $x$  požadované množství naředěné DNA,  $y$  požadovaná koncentrace zředěné DNA a  $z$  je naměřená koncentrace DNA. Po naředění do PCR desky byly vzorky skladovány v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Izolace DNA byla provedena pro všech 95 vzorků (47 colon, 48 caecum). Veškeré naměřené a spočtené hodnoty jsou v tabulce v Příloze A.

### 3.4 Amplifikace 16s rRNA – PCR

Polymerázová řetězová reakce umožňuje zmnožení vybraného úseku molekuly DNA in vitro. Vybraným úsekem je gen pro 16s rRNA, který sdílejí všechny bakterie.

#### Reagencie

Tabulka 3.3: Reagencie pro reakci PCR [53]

Izolovaná DNA – koncentrace 20 ng/μl	1 μl
Forward primer – 10x 338 GC (konc. 10 μM)	1 μl
Reverse primer – 10x 534 RP (konc. 10 μM)	1 μl
PCR mix – OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	15 μl
PCR voda	12 μl
Celkem na 1 vzorek	30 μl

#### Postup

Do eppendorfky jsme smíchali reagencie pro 100 vzorků (50 caecum, 50 colon) podle tabulky 3.3 [53].

PCR směs jsme aplikovali do PCR desky po 29 μl do každé jamky. Do každé jamky s mixem jsme přidali 1 μl naředěné DNA a PCR desku zalepili folií, aby nedošlo při PCR reakci k vypaření vzorků.

Desku jsme vložili do termocyklieru Biometra TAdvanced. Amplifikace probíhala podle programu PCR - DGGE, jehož parametry jsou zaneseny do tabulky 3.4.

Tabulka 3.4: Detaily programu PCR-DGGE [53]

Krok	°C	Čas	Opakování
1	95,0	5 minut	34 cyklů
2	95,0	30 sekund	
3	61,0	20 sekund	
4	72,0	40 sekund	
5	72,0	5 minut	
6	8,0	∞	

Celkový čas PCR reakce je 1 hodina 17 minut a 58 sekund.

Získaných 95 vzorků bylo identifikováno elektroforézou.

### 3.5 Agarózová elektroforéza

Namnožené fragmenty DNA se nanesou do jamek v připraveném gelu a po puštění elektrického proudu dojde k jejich migraci skrz gel. Po zobrazení gelu bychom měli identifikovat produkt o velikosti cca 200 pb.

#### Reagencie

Tabulka 3.5: Reagencie potřebné pro přípravu 3 gelů na agarózovou elektroforézu

PCR Agaróza Top-Bio	1,5 g
0,5x TBE pufr	100 ml
Ethidium bromid	2,5 $\mu$ l

1,5 g agarózy jsme rozpustili ve 100 ml 0,5x TBE (zahřátím na magnetickém míchadle). Po zchlazení na 50 °C jsme přidali Ethidium bromid a promíchali. Gel jsme nalili do připravené vaničky, do které jsme vložili hřebínek pro vytvoření startovacích jamek pro nanášení vzorků a gel nechali ztuhnout (45 minut).

Ztuhlý gel jsme vložili do elektroforetické vany a zalili 0,5x TBE do úplného ponoření. Do první jamky jsme napipetovali 5  $\mu$ l standardu a do ostatních po 2,5  $\mu$ l vzorků získaných z PCR reakce. Po přikrytí víkem a následném propojení elektrod jsme nastavili elektrický proud na 90 V. Po 30 minutách jsme vanu odpojili, vyndali gel a vložili jej do transiluminátoru propojeného s počítačem. V programu Bio-Capt jsme gel zobrazili. U všech gelů byly zřetelné jasné úseky (bandy) o velikosti cca 200 pb, což potvrdilo úspěšnost PCR reakcí.



## 3.6 Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE

Metoda PCR-DGGE se využívá pro analýzu rozmanitosti mikrobiálních společenstev na základě sekvence DNA. Namnožené fragmenty genu 16S rRNA jsou oddělovány v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem od 35 % do 60 %. Gel obsahuje formamid a ureu, které rozplétají dvoušroubovici DNA.

Realizaci DGGE jsme provedli podle protokolu výrobce [53].

### 3.6.1 Příprava roztoků

#### Reagencie

Tabulka 3.6: Reagencie pro přípravu roztoků na DGGE gel

	35% gel	60% gel
40% akrylamid	5,56 ml	5,56 ml
50% TAE pufr	0,5 ml	0,5 ml
Formamid	3,5 ml	6 ml
Močovina	3,675 g	6,3 g
dH <sub>2</sub> O	do 25 ml	
APP 10%	200 µl	
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	20 µl	

#### Postup

Podle tabulky 3.6 jsme připravili dva roztoky, které se při lití gelu mísí. Smíchali jsme močovinu, TAE pufr, akrylamid, formamid a dolili jsme dH<sub>2</sub>O do celkového objemu 25 ml. Na magnetické míchače jsme nechali reagencie rozpustit a skladovali v lednici při 4 °C.

10% APP a TEMED jsme přidali bezprostředně před mícháním roztoků při nalévání gelu.

### 3.6.2 Sestavení aparatury, nalití gelu a nanesení vzorků

Sestavili jsme aparaturu pro nalití gelu. Mezi velké a malé sklo jsme vložili spacers a opatrně dali do bočnic. Mezi skla jsme aplikovali kartu a podle ní nastavili správnou vzdálenost rozperek (spacerů) od sebe. Lehce jsme přitlačili bočnice, utáhli šrouby, pod skla jsme vložili gumu a přenesli do přední části stojanu, dotáhli jsme páčky.

Sestavení aparatury je klíčovou věcí pro další analýzy. Při chybném sestavení může gel částečně nebo zcela vytéci, což poruší koncentrační gradient.

Připravili jsme si dva roztoky. Při nalévání gelu se využívá spojených nádob (obrázek 3.7). Nejdříve jsme otestovali jejich dobrou průchodnost. Kohoutem jsme uzavřeli spojovací trubici nádob a do každé nádoby nalili dH<sub>2</sub>O, pustili jsme čerpadlo, otevřením kohoutu jsme obě nádoby propojili. Hadičku s injekční jehlou jsme vložili do odpadní kádinky a sledovali proud dH<sub>2</sub>O, který musel být rovnoměrný, do odtečení veškerého objemu dH<sub>2</sub>O. Opět jsme uzavřeli spojovací kohout.

Přibližně 25 ml roztoků jsme nalili do nádob, koncentrovanější roztok do nádoby u výpusti. Injekční jehlu s hadičkou jsme aplikovali mezi skla. Spojené nádoby byly umístěny na magnetickou míchačku. Do obou roztoků jsme přidali 200 µl APP a 20 µl TEMEDu. Otočením kohoutu jsme spojili nádoby, zapnuli jsme čerpadlo a čekali, až hladina gelu mezi skly bude sahat 5 mm pod okraj. Vypnuli jsme čerpadlo a vložili hřebínek do gelu. Nechali jsme 45–60 minut polymerovat, spojené nádoby jsme 3x promyli dH<sub>2</sub>O, aby se materiál používaný na gel odplavil a nepolymeroval v hadičce nebo v injekční jehle.



Obrázek 3.6: Spojené nádoby a čerpadlo

Do elektroforetické vany (obrázek 3.8) jsme doplnili 1% TAE a zapli zahřívání na 60 °C. Po ohřátí pufru a polymerizaci gelu jsme aparaturu s gelem mezi skly vložili do elektroforetické vany. Po odstranění hřebenu jsme vzniklé jamky pomocí injekční stříkačky s jehlou promyli pufrům, aby se z jamek vyplavily zbytky gelu.

Poté jsme nanесли vzorky do jamek, zavřeli víko vany a zapli zahřívání a elektrický zdroj na 30 V. Po znovudosažení 60 °C jsme zvýšili elektrické napětí na 60 V. DGGE elektroforéza probíhala 17 hodin.

Poté jsme vypli zdroj i zahřívání a počkali pár minut, než elektrody zchladnou. Aparaturu s gelem a vzorky jsme vyjmuli a nechali 5 minut chladnout. Mezitím jsme připravili lázeň na barvení gelu.



Obrázek 3.7: Elektroforetická vana na DGGE

### 3.6.3 Barvení a vyhodnocení

Pro vizualizaci vzorků v gelu je nutno jej obarvit, v našem případě jsme použili barvivo SYBR Green. Během chladnutí gelu jsme připravili lázeň na barvení. Do plastové misky jsme nalili 50 ml 1x TAE a připipetovali 5  $\mu$ l barviva SYBR Green. Z aparatury jsme vyjmuli skla s gelem, odstranili spacery a malé sklo, ořízli jsme jamky a roh gelu (kvůli identifikaci), přenesli jej do misky s barvivem a uložili na 30 minut na míchačku.

Po 30 minutách barvení jsme gel vložili do transiluminátoru BIO RAD Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ se softwarem Image Lab a vyfotili. Získali jsme elektroforetický profil mikrobiomu. Ve 4 gelech jsme zpracovali všech 95 vzorků (47 colon, 48 caecum), gely byly následně vyhodnoceny. Vybrali jsme celkem 22 významných úseků (bandů), které jsme dále analyzovali.

### 3.6.4 Identifikace bakterií z DGGE gelu

Po vyhodnocení a výběru vhodných úseků bylo nutné z nich DNA získat zpět a identifikovat, o jakou bakterii se jedná. Gel jsme prosvítili UV zářením, což nám zviditelnilo obarvené úseky. Určené úseky jsme vyřízli a vložili do eppendorfký, přidali 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. DNA jsme skladovali v -20 °C.

Pro další zpracování jsme DNA namnožili a purifikovali.

Před samotnou PCR jsme vyříznuté kousky gelu protřepali na vortexu, aby se DNA uvolnila z gelu, a odstředili v centrifuze (10000 rpm, 10 minut).

#### PCR a agarózová elektroforéza

DNA z fragmentů gelu byla zmnožena PCR reakcí. Tabulka 3.7 udává reagenty pro PCR.

Tabulka 3.7: Reagenty pro reakci PCR z fragmentů gelu

dH <sub>2</sub> O + DNA	5 $\mu$ l
Forward primer – 10x 341 FP	1 $\mu$ l
Reverse primer – 10x 534 RP	1 $\mu$ l
PCR mix – OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	15 $\mu$ l
PCR voda	8 $\mu$ l
Celkem na 1 vzorek	30 $\mu$ l

Postupovali jsme stejně jako pro amplifikaci genu 16S rRNA v kapitole 3.4 Amplifikace 16S rRNA - PCR. Podle tabulky 3.7 jsme připravili PCR směs pro 25 vzorků a aplikovali ji do PCR desky po 25  $\mu$ l, do každé jamky s mixem jsme přidali 5  $\mu$ l DNA. PCR desku jsme zalepili fólií, aby při PCR reakci nedošlo k vypaření vzorků.

Desku jsme vložili do termocyklieru Biometra TAdvanced a zapli program PCR - DGGE, jehož parametry jsou zaneseny v tabulce 3.4 v kapitole 3.4 Amplifikace 16S rRNA - PCR

Produkty reakce PCR jsme identifikovali gelovou elektroforézou. Postup byl totožný jako v kapitole 3.5 Agarózová elektroforéza.

Popsaným postupem jsme zpracovali všech 22 vzorků. Poté jsme provedli purifikaci amplifikované DNA pomocí komerčně dostupné sady QIAquick PCR purification kit.

### **Purifikace DNA**

Purifikace DNA probíhá na bázi membrány z oxidu křemičitého, na kterou se DNA váže za přítomnosti vyšší koncentrace solí. Následuje eluce vodou nebo pufrům s nízkou koncentrací solí. DNA je zbavena primerů, zbytkových nevázaných nukleotidů, enzymů, agarózy z gelu, ethidium bromidu a dalších nečistot.

Při purifikaci jsme dodržovali postup doporučený výrobcem.

Ke každému PCR produktu (cca 28  $\mu$ l) jsme přidali 140  $\mu$ l roztoku Buffer PB. Vzorky jsme přenesli do kolonky QIAquick column, odstředili v centrifuze (13000 rpm, 60 s) a objem spodní části kolony vylili. Na membránu jsme nanесли 750  $\mu$ l roztoku Buffer PE a opět odstředili (13000 rpm, 60 s). Po vylití jsme provedli ještě jednu centrifugaci (13000 rpm, 120 s), tentokrát samotné kolony, aby se odstředily poslední zbytky roztoků ulpívajících společně s DNA na membráně.

Všechny kolony jsme na 3 minuty otevřeli, aby se odpařil zbývající ethanol obsažený v roztoku Buffer PE. Část kolony s membránou jsme vložili do nových eppendorfek. Do centra membrány jsme aplikovali 30  $\mu$ l EB pufru, aby se DNA uvolnila z membrány. Zkumavky s částí kolony jsme stočili na centrifuze (13000 rpm, 60 sekund), abychom odstředili DNA.

U všech 22 vzorků jsme na NanoDropu One<sup>c</sup> změřili koncentraci DNA.

### **3.6.5 Sangerovo sekvenování**

Vzorky pro Sangerovo sekvenování jsme připravili podle požadavků společnosti SEQme, která je osekvenovala.

Pročištěnou a amplifikovanou DNA jsme smíchali s 2,5  $\mu$ l sekvenačního primeru a dH<sub>2</sub>O, aby celkový objem jednoho vzorku byl 10  $\mu$ l. Pro PCR produkt o délce do 500 pb je pro úspěšnou sekvenaci potřeba cca 50 ng DNA. Například pro změřenou koncentraci 13,17 ng/ $\mu$ l bylo smícháno 2,5  $\mu$ l primeru, 4  $\mu$ l DNA a 3,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O.

V příloze B je vložena tabulka s naměřenými hodnotami koncentrace DNA, včetně informací o namíchání výsledných vzorků k sekvenaci.

Všech 22 vzorků jsme v označených eppendorfkách odnesli do schránky SEQme na Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

Výsledky nám byly doručeny elektronicky během dvou dní. Následně jsme zpracovali v programu Geneious (<https://www.geneious.com/>). Získané sekvence jsme porovnali s databází <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> a sestavili tabulku nejpravděpodobnějších druhů bakterií ke každému vzorku. Celá tabulka je vložena v kapitole 4.3 PCR-DGGE. Vygenerovali jsme fylogram, který bude dále komentován v kapitole 4 Výsledky a kapitole 5 Diskuze.

### 3.7 Stanovení mikrobiální diverzity metodou NGS

Sekvenování nové generace poskytuje rychlé a přesné informace o genomech. Lze zpracovávat velký počet různé DNA. V současné době je dostupno několik komerčních platform. V této práci bylo použito sekvenování nové generace podle Ion Torrent™ Platforms od KAPA BIOSYSTEMS.

Postupovali jsme podle protokolu NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent od BioLabs Inc. a podle KAPA Library Quantification Kit, Torrent™ Platforms.

Celé sekvenování nové generace obsahuje několik kroků, které budou následně popsány.

#### Izolace DNA

Pro izolaci DNA jsme použili komerční sadu QIAamp® PowerFecal® DNA Kit. Pro následující kroky jsme použili mikrobiální DNA, kterou jsme pomocí této sady izolovali a která byla dále amplifikována a zpracovávána DGGE a Sangerovým sekvenováním.

Podrobný postup izolace je popsán v kapitole (kapitola 3.3 Izolace DNA).

#### Příprava amplikonů

Amplifikovali jsme gen 16S rRNA vyskytující se u všech druhů bakterií.

Tabulka 3.8: Reagencie pro PCR na NGS

Izolovaná DNA	1, 5 µl
Forward primer – BactBF (GGATTAGATACCCTGGTAGT)	1 µl
Reverse primer – BactBR (CACGACACGAGCTGACG)	1 µl
PCR mix – OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	15 µl
PCR voda	11,5 µl
Celkem na 1 vzorek	30 µl

Přípravu amplikonů jsme provedli podle Fliegerová a col. 2014 [70]. Zpracovávali jsme rovněž 48 vzorků caeca a 47 vzorků colonu.

Samotná PCR proběhla v termocykleru Biometra TAdvanced, zvolili jsme program popsáný v tabulce 3.9.

Tabulka 3.9: Detaily programu pro amplifikaci 16S rRNA pro NGS

Krok	°C	Čas	Opakování
1	95,0	10 minut	34 cyklů
2	95,0	30 sekund	
3	57,0	30 sekund	
4	72,0	30 sekund	

Poté jsme agarózovou elektroforézou ověřili, že amplifikace proběhla úspěšně. Postup byl stejný jako v kapitole 3.5 Agarózová elektroforéza. Očekávaná délka zobrazeného produktu byla 300 bp.

Následně jsme všech 97 amplifikovaných vzorků pročistili sadou QIAquick PCR purification kit. Dodržovali jsme postup doporučený výrobcem, popsáný v kapitole 3.6.4 Identifikace bakterií z DGGE gelu. DNA jsme eluovali do 35  $\mu$ l EB pufru. U všech vzorků jsme spektrofotometricky změřili koncentraci na NanoDropu One<sup>c</sup>, která se měla pohybovat mezi 20 a 40 ng/ $\mu$ l.

DNA jsme přenesli do dvou PCR desek. Na jedné desce byly pouze vzorky pro caecum a na druhé pro colon. Každou desku jsme zpracovávali zvlášť, postup byl totožný.

### Příprava knihovny

Dodržovali jsme postup doporučený protokolem NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent od BioLabs Inc.

Na produkty PCR byly navázány sekvenační adaptéry (barkódy), které se používají ke specifickému označení všech vzorků. Příprava knihovny se skládá z několika kroků popsáných níže.

#### 1. „End repair“

Do eppendorfky jsme připravili směs pro 50 vzorků podle tabulky 3.10.

Tabulka 3.10: Reagencie pro směs v kroku „End repair“

Počet vzorků	1	50
EB buffer (End Repair Reaction Buffer)	3 $\mu$ l	150 $\mu$ l
ER enzym (End Repair Enzyme Mix)	1,5 $\mu$ l	75 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	20,5 $\mu$ l	1025 $\mu$ l
Celkový objem	25 $\mu$ l	1250 $\mu$ l

Do každé jamky (48) nové desky jsme přidali 25  $\mu$ l směsi a 5  $\mu$ l DNA. Desku jsme inkubovali v termocykleru 20 min při teplotě 25 °C, pak 10 minut při teplotě 70 °C. Desku se vzorky jsme zchladili v lednici.

## 2. Ligace adaptorů

Připravili jsme další roztok podle tabulky 3.11.

Tabulka 3.11: Reagencie pro směs v kroku Ligace adaptorů

Počet vzorků	1	50
T4 Ligase Buffer	5 $\mu$ l	250 $\mu$ l
P1 Adaptor	0,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
DNA polymeráza	0,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l
T4 Ligase	3 $\mu$ l	150 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Celkový objem	19 $\mu$ l	950 $\mu$ l

Ke každému vzorku z kroku 1. „End repair“ jsme přidali po 19  $\mu$ l nového roztoku a 1  $\mu$ l barkódu (IonExpress, Life Technologies) ze zásobní PCR desky. Jedná se o krátkou unikátní sekvenci, podle které se vzorky spojení do jedné knihovny identifikují [71]. Pečlivě jsme si zaznamenali čísla vzorků a k nim přiřazené číslo barkódu. Schematické zobrazení čísel vzorků s přiřazenými barkódy je udáno v tabulce 3.12.

Tabulka 3.12: Uspořádání vzorků s přiřazenými barkódy (pro caecum)

CAECUM		1	2	3	4	5	6	7	8	Diet
Samples	<b>A</b>	1	7	13	17	23	33	39	46	cHFc
	<b>B</b>	2	8	14	18	24	30	34	40	cHFc-F
	<b>C</b>	3	9	45	19	25	29	35	41	Krill-H
	<b>D</b>	4	10	15	20	26	48	36	42	Krill-L
	<b>E</b>	5	11	16	21	27	32	37	43	CaL-L
	<b>F</b>	6	12	22	28	31	38	44	47	STD
Barcodes	<b>A</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	
	<b>B</b>	9	10	11	12	13	14	15	16	
	<b>C</b>	17	18	19	20	21	22	23	24	
	<b>D</b>	25	26	27	28	29	30	31	32	
	<b>E</b>	33	34	35	36	37	38	39	40	
	<b>F</b>	41	42	43	44	45	46	47	48	

Z tabulky 3.12 je patrné uspořádání očíslovaných vzorků a jejich barkódů. V první části jsou vzorky rozděleny do řádek podle druhu diety. Ve druhé části tabulky jsou čísla

čárových kódů. Pro lepší orientaci uvedu příklady: Ke vzorku číslo 1 (myš s vysokotučnou dietou cHFc) na pozici A1 byl přidán čárový kód číslo 1 ze stejné pozice na desce, jako je vzorek (A1). Ke vzorku číslo 31 (myš s nízkotučnou dietou STD) na pozici F5 byl přidán barkód na stejné pozici (F6) číslo 45.

Protože jsme zpracovávali zvláště vzorky pro caecum a pro colon, mohla být použita stejná sada čárových kódů. Pro colon vypadá tabulka vzorků a jejich čárových kódů stejně, vyjma chybějícího vzorku číslo 18.

PCR desku jsme inkubovali v termocykleru po dobu 15 minut za teploty 25 °C a 5 minut za teploty 65 °C. Vzorky jsme zchladili v lednici.

### 3. Purifikace s kuličkami AmpureBeads

Dalším krokem je pročištění DNA použitím magnetických kuliček. Objem směsi v jamkách je 50 µl. Do každé jamky jsme přidali 60 µl roztoku obsahující magnetické kuličky s povrchem s karboxylovými skupinami, na který se naváže DNA. Promíchali jsme pipetou a nechali inkubovat 5 minut. PCR desku jsme vložili na speciální magnetický stojan. Kuličky s DNA byly po 2-3 minutách fixovány na stěnu jamky u magnetu a supernatant zůstal čirý. Pipetou jsme jej bez dotyku špičky kuliček odstranili. Do každé jamky jsme přidali 180 µl 70% ethanolu, sundali desku z magnetu a inkubovali asi 30 sekund. Opět jsme pod desku vložili magnetický stojan (ale o jamku jsme jej posunuli, aby kuličky migrovaly k jiné stěně. Po odstranění ethanolu jsme tento krok zopakovali a následně nechali zbylý ethanol v jamkách odpařit, sundali desku ze stojanu a po 5 minutách jsme do každé jamky přidali 50 µl dH<sub>2</sub>O, aby se pročištěná DNA uvolnila z povrchu kuliček. Směs jsme promíchali pipetou a opět sečkali 5 minut. Desku jsme vrátili na magnetický stojan. Kuličky se shromáždily na stěně jamek u magnetu. Supernatant nyní obsahoval pročištěnou DNA ve vodném roztoku. 40 µl supernatantu jsme přenesli do nové desky [72].

### 4. Amplifikace

Připravili jsme mix primerů a PCR Mastermixu podle tabulky 3.13.

Tabulka 3.13: Reagencie pro směs v kroku Amplifikace

Vzorky	1	50
Primery NEBNext Library Primers for Ion Torrent	2 µl	100 µl
NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix	25 µl	1250 µl
Celkový objem	27 µl	1350 µl

Do nové PCR desky jsme napipetovali 27 µl směsi z tabulky 3.13 a přidali 23 µl purifikované DNA z předchozího kroku. Desku jsme složili do termocykleru a provedli PCR reakci. Program amplifikace je popsán v tabulce 3.14.





Tabulka 3.16: Schéma PCR desky pro qPCR

	STANDARDS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	2	3	4	5	6	KAPPA 1	I. TORR. 1
B	7	8	9	10	11	12	KAPPA 2	I. TORR. 2
C	13	14	15	16	17	18	KAPPA 3	I. TORR. 3
D	19	20	21	22	23	24	KAPPA 4	I. TORR. 4
E	25	26	27	28	29	30	KAPPA 5	I. TORR. 5
F	31	32	33	34	35	36	KAPPA 6	dH <sub>2</sub> O
G	37	38	39	40	41	42		
H	43	44	45	46	47	48		

Koncentrace standardů ukazuje tabulka 3.17.

Tabulka 3.17: Koncentrace standardů KAPPA a ION TORRENT

	Koncentrace KAPPA (pM)	Koncentrace ION TORRENT (pM)
STD 1	83	6,8
STD 2	8,3	0,68
STD 3	0,83	0,068
STD 4	0,083	0,0068
STD 5	0,0083	0,00068
STD 6	0,00083	

Dále jsme provedli qPCR podle následujících parametrů (tabulka 3.18). Po vyhodnocení výsledků jsme DNA naředili na koncentraci 26 pM.

Tabulka 3.18: Parametry qPCR

Krok	°C	Čas	Opakování
1. úvodní denaturace	95,0	5 minut	
2. denaturace	95,0	30 sekund	34x
3. annealing	60,0	45 sekund	
4. analýza křivky tání		65,0 – 95,0	

Naměřená koncentrace platí pro 1000x naředěnou DNA. Pro ředění na 26 pM je nutno znát původní koncentrace. Naměřené hodnoty koncentrace DNA vynásobíme 1000x. Pro zjištění koncentrací zředěné DNA 1:20 vydělíme koncentraci neředěné DNA 20. Podle vzorce 3 jsme spočetli objem dH<sub>2</sub>O, ke kterému přidáme 1 μl DNA naředěné v poměru 1:20.

$$V_{dH_2O} = \frac{C_{1:20}}{26} - 1 \quad (3)$$

kde  $c_{1:20}$  je koncentrace 50x zředěné DNA.

Do malé eppendorfky jsme nanесли po 1  $\mu$ l 26pM DNA od každého vzorku a skladovali do dalších kroků v lednici. Všechny PCR desky s DNA jsme uložili do -20 °C.

### **Příprava templátu**

Templát jsme připravili využitím komerční sady Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit na přístroji Ion OneTouch™ 2 System (Thermofisher Scientific). Postupovali jsme podle příručky dostupné na webu <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4474779> a podle návodu přiloženého v příloze C.

### **Sekvenování templátu**

Další den jsme pokračovali se vzorkem získaným z přístroje Ion OneTouch™ 2 System. Pro sekvenaci jsme použili komerční sadu Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (platforma Ion Torrent) a čip Ion 316 Chip Kit v2 (střední kapacita) BC. Postupovali jsme přesně podle protokolu přiloženého v příloze D. Výsledkem byly sekvence ve formátu \*.fastq. Čísla získaných sekvencí odpovídala číslům barkódů.

### **Analýza dat**

Ze serveru Ion Torrent jsme získali všechny sekvence ve formátu \*.fastq, exportovali je do programu QIIME a dále zpracovávali.

QIIME je software provádějící analýzu mikrobiální komunity. Používá se pro analýzu a interpretace výsledků pro sekvenční data získaná z NGS (sekvence genu 16S rRNA). To zahrnuje demultiplexování a filtrování, výběr OTU (operační taxonomická jednotka, organismy seskupené na základě podobnosti sekvencí DNA), taxonomické zařazení a fylogenetickou rekonstrukci, dále také rozmanité analýzy a vizualizace [73, 74].

Použití softwaru QIIME k analýze dat z mikrobiálních komunit se skládá z napsání série příkazů do terminálového okna a zobrazení grafického a textového výstupu. Veškeré zpracování se provádí v Linuxu. Vycházeli jsme z webových stránek [www.qiime.org](http://www.qiime.org), kde jsou přesné návody na vytvoření mapping file a popisy skriptů [73].

Každému vzorku a jeho barkódu jsme přiřadili Sample ID, pod kterým dále vzorek vystupoval při další analýze. Sample ID bylo přiřazeno po seskupení vzorků podle diet. Ukázka je zobrazena v tabulce 3.19 (sloupec mouse zobrazuje číslo myši, pod kterým byla chována při experimentu). Protože získané soubory \*.fastq byly očíslovány podle barkódů, bylo nutné tato data přejmenovat, aby čísla barkódů odpovídala Sample ID.

Tabulka 3.19: Ukázka označení vzorků – sample ID, barkód a číslo vzorku

sample ID	barcode	sample	location	mouse	diet
1	41	6	caecum	23	STD
2	42	12	caecum	37	STD
13	5	23	caecum	21	CHFc
14	6	33	caecum	15	CHFc
17	9	2	caecum	42	CHFc-F
18	10	8	caecum	8	CHFc-F

Dále jsme připravili soubor Maps.txt, obsahující všechny informace o jednotlivých vzorcích potřebné pro provedení analýzy: Sample ID, sekvence primeru, název experimentu, číslo vzorku, číslo myši, orgán a druh diety. Názvy vzorků mohou obsahovat pouze alfanumerické znaky (A-z, 0-9) a tečku (.) [73]. Náhled souboru Maps můžeme vidět na obrázku 3.9, celý soubor Maps v příloze E.

```

1 #SampleID BarcodeSequence LinkerPrimerSequence Study Sample Mouse Tract Description
2 1 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 6 23 caecum STD
3 2 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 12 37 caecum STD
4 3 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 22 26 caecum STD
5 4 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 28 32 caecum STD
6 5 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 31 54 caecum STD
7 6 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 38 47 caecum STD
8 7 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 44 52 caecum STD
9 8 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 47 49 caecum STD
10 9 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 1 16 caecum CHFc
11 10 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 7 7 caecum CHFc
12 11 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 13 31 caecum CHFc
13 12 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 17 51 caecum CHFc
14 13 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 23 21 caecum CHFc
    
```

Obrázek 3.8: Soubor Maps.txt

Ze souboru Maps jsme připravili mapping files. Pro každý vzorek (celkem 95) jsme vytvořili jednu složku, do které jsme umístili příslušnou část z Maps. Na obrázku 3.10 je zobrazen obsah mapping file pro vzorek se Sample ID 11.

```

1 #SampleID BarcodeSequence LinkerPrimerSequence Study Sample Mouse Tract Description
2 11 GGATTAGATACCCTGGTAGT obesity 13 31 caecum CHFc
    
```

Obrázek 3.9: Maps11, obsah složky mapping file pro vzorek se Sample ID 11

Po spuštění QIIME jsme nahráli všechna data. Podle přílohy F jsme spouštěli jednotlivé příkazy, které budou níže popsány. V příloze jsou uvedeny příkazy pro jeden vzorek caeca.

```
convert_fastaqual_fastq.py
```

Ze souboru FASTA (zápis nukleotidové sekvence) generuje soubor FASTQ (nukleotidové sekvence s hodnotami kvality). Výstupní soubor FASTQ označený jako ".fastq", se vygeneruje ve specifikovaném výstupním adresáři se stejným názvem

jako soubor FASTA. Soubor FASTQ je v určeném výstupním adresáři rozdělen na soubory FASTA a QUAL [74].

```
validate_mapping_file.py
```

Příkaz zkontroluje soubor mapping file, zda má platný formát. Kontroluje sekvence barkódů, primerů, zjistí, jestli nejsou duplikovaná data sample ID nebo barkódů. Dále kontroluje datová pole a případný výskyt neplatných znaků. Na chyby je upozorněno v protokolu. Příkaz dokáže nahradit všechny neplatné znaky nebo vytvořit html soubor, který bude obsahovat umístění chyb a jejich zvýraznění [74].

```
split_libraries.py
```

Skript umožňuje analyzovat více sekvenčních cyklů paralelně. Přiřazuje jednotlivé barkódy vzorkům a seřadí je. Výsledné soubory splňují uživatelem zadané parametry, jako je délka sekvence, oříznutí sekvence a minimální kvalita. Dále skript přejmenuje ready podle zadaného Sample ID [74].

```
cat '/home/qiime/pgm/01/01_split/seqs.fna'
```

Všechny soubory jsou sestříhány, spojeny a uloženy do jednoho souboru. V tomto kroku je možné do souboru nezahrnout vzorky s nízkým počtem sekvencí, a tím je tedy vyřadit. U vzorků caecum byly takto vyřazeny 3 vzorky, u colonu 14 [74].

```
validate_demultiplexed_fasta.py
```

Zkontroluje soubor fasta, zda byl správně demultiplexován a jestli je to platný formát obsahující pouze platné nukleotidové znaky. Dále také kontroluje shodu Sample ID s daty v přiloženém mapping file [74].

```
identify_chimeric_seqs.py
```

Identifikuje a odstraňuje chimérické sekvence vytvoření při amplifikaci DNA [74].

```
pick_open_reference_otus.py
```

Vybere operační taxonomické jednotky (OTU). Skript je rozdělen do 4 možných kroků výběru OTU a 2 kroků pro vytvoření taxonomických stromů a tabulek, které jsou dále zpracovávány. V našem případě bylo používáno open reference clusterování, kdy jsou sekvence porovnávány s databází. Neshodující se sekvence nejsou vyřazeny, ale jsou shlukovány mezi sebou [74].

```
biom summarize-table-i
```

Do nového souboru specifikovaného parametrem *i* poskytne souhrn informací o počtech na základě vzorků [74].

```
core_diversity_analyses.py
```

Skript pro spuštění základní sady analýz diverzity QIIME. Generuje grafy beta diversity (rozdíl mezi jednotlivými mikrobiálními komunitami), alpha diversity (rozmanitost v rámci mikrobiální komunity), taxonomické grafy apod. Využívá tabulku OTU a fylogenetický strom vytvořený v předchozích krocích [73, 74].

```
alpha_diversity.py
```

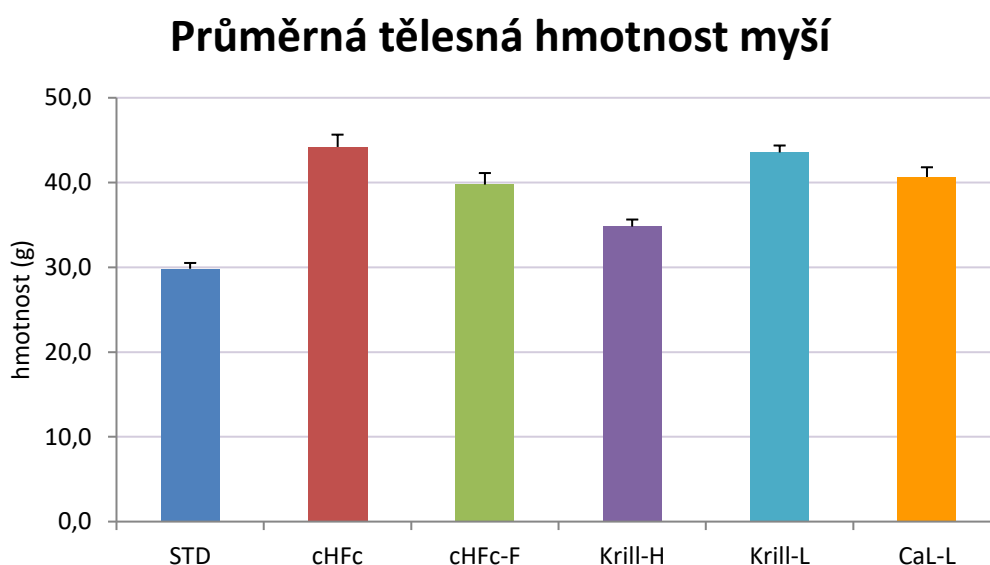
Vypočtení alpha diversity z OTU tabulky [74].

## 4 Výsledky

### 4.1 Tělesná hmotnost myší

Data byla získána z laboratoře Biologie tukové tkáně, kde byl experiment prováděn.

Na obrázku 4.1 je graf zobrazující průměrné tělesné hmotnosti pro všechny skupiny myší s experimentální dietou, hmotnosti byly zjištěny po 8 týdnech podávání experimentálních diet (na konci experimentu).



Obrázek 4.1: Graf zobrazující průměrnou tělesnou hmotnost myší na konci experimentu

### 4.2 Vzorky a DNA

Následující tabulky 4.1 a 4.2 zobrazují seznam všech zpracovávaných vzorků společně s doplňujícími informacemi o myších a koncentrace izolované DNA. Izolace DNA s užitím komerční sady byla popsána v kapitole 3.3 Izolace DNA.

Tabulka 4.1: Caecum: seznam zpracovávaných vzorků rozdělených podle diet, koncentrace izolované DNA

Dieta	Číslo vzorku	Trakt	Číslo myši	Koncentrace izolované DNA (ng/ul)	Hmotnost myši (g)
STD	6	caecum	23	177,6	31,1
	12	caecum	37	136,7	28,2
	22	caecum	26	179,2	31,3
	28	caecum	32	126,7	25,7
	31	caecum	54	128,2	31,0

Dieta	Číslo vzorku	Trakt	Číslo myši	Koncentrace izolované DNA (ng/ul)	Hmotnost myši (g)
STD	38	caecum	47	162,8	30,7
	44	caecum	52	208	30,5
	47	caecum	49	104,7	30,3
cHFc	1	caecum	16	126	43,4
	7	caecum	7	165,6	42,3
	13	caecum	31	125,3	47,4
	17	caecum	51	32,2	40,3
	23	caecum	21	130,6	47,9
	33	caecum	15	143,7	37,1
	39	caecum	29	172,6	48,1
	46	caecum	30	203,5	47,2
cHFc – F	2	caecum	42	74	34,2
	8	caecum	8	166,4	40,7
	14	caecum	34	68,4	43,4
	18	caecum	6	95,7	35,3
	24	caecum	18	164,3	41,7
	30	caecum	45	99,5	40,7
	34	caecum	27	162,9	37,2
	40	caecum	38	95,8	45,0
Krill – H	3	caecum	50	108	34,4
	9	caecum	33	102	35,6
	45	caecum	10	86,9	37
	19	caecum	13	124,1	34,1
	25	caecum	17	116,7	35,5
	29	caecum	20	110,9	36,1
	35	caecum	19	133,5	29,5
	41	caecum	9	130,1	36,4
Krill – L	4	caecum	24	163,2	43,5
	10	caecum	36	148,4	43,0
	15	caecum	12	78,9	44,7
	20	caecum	41	156,2	40,6
	26	caecum	11	102,5	46,0
	48	caecum	25	181,7	47,3
	36	caecum	48	191,8	42,0
	42	caecum	53	195,5	41,4
Cal – L	5	caecum	22	107,1	38,1
	11	caecum	14	112,6	37,8
	16	caecum	46	148,9	44,5
	21	caecum	40	78,6	36,9
	27	caecum	2	72,2	44,1
	32	caecum	3	161,9	41,5
	37	caecum	28	134,5	44,0
	43	caecum	1	145,8	38,1



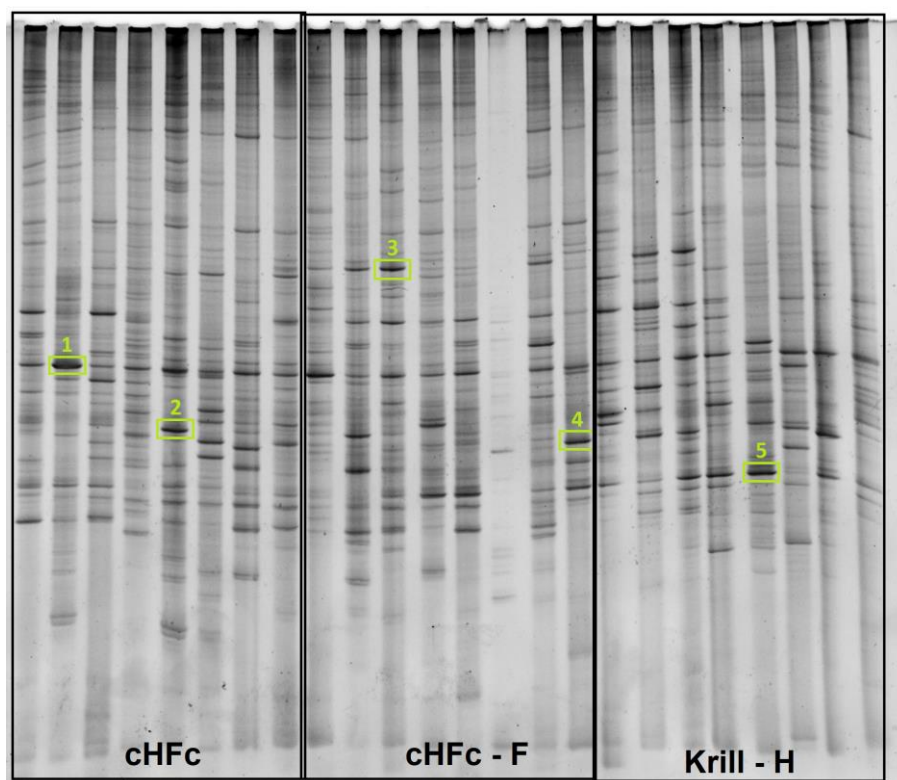
Tabulka 4.2: Colon: seznam zpracovávaných vzorků rozdělených podle diet, koncentrace izolované DNA

Dieta	Číslo vzorku	Trakt	Číslo myši	Koncentrace izolované DNA (ng/ul)	Hmotnost myši (g)
STD	6	colon	23	174,3	31,1
	12	colon	37	62,3	28,2
	22	colon	26	173,1	31,3
	28	colon	32	66,7	25,7
	31	colon	54	134,5	31,0
	38	colon	47	110,1	30,7
	44	colon	52	141,7	30,5
	47	colon	49	80,7	30,3
cHFc	1	colon	16	103,3	43,4
	7	colon	7	143,3	42,3
	13	colon	31	50,5	47,4
	17	colon	51	154,5	40,3
	23	colon	21	39,8	47,9
	33	colon	15	61,2	37,1
	39	colon	29	86,8	48,1
	46	colon	30	102,7	47,2
cHFc – F	2	colon	42	54,3	34,2
	8	colon	8	167,7	40,7
	14	colon	34	114,6	43,4
	18	colon	6	není	35,3
	24	colon	18	73,7	41,7
	30	colon	45	82,3	40,7
	34	colon	27	157,5	37,2
	40	colon	38	80,7	45,0
Krill – H	3	colon	50	68,3	34,4
	9	colon	33	124,1	35,6
	45	colon	10	19,1	37
	19	colon	13	58	34,1
	25	colon	17	118,8	35,5
	29	colon	20	63,2	36,1
	35	colon	19	64,5	29,5
	41	colon	9	93,6	36,4
Krill – L	4	colon	24	108	43,5
	10	colon	36	109,9	43,0
	15	colon	12	73,4	44,7
	20	colon	41	107	40,6
	26	colon	11	102,9	46,0
	48	colon	25	126,8	47,3
	36	colon	48	85,2	42,0
	42	colon	53	110,7	41,4

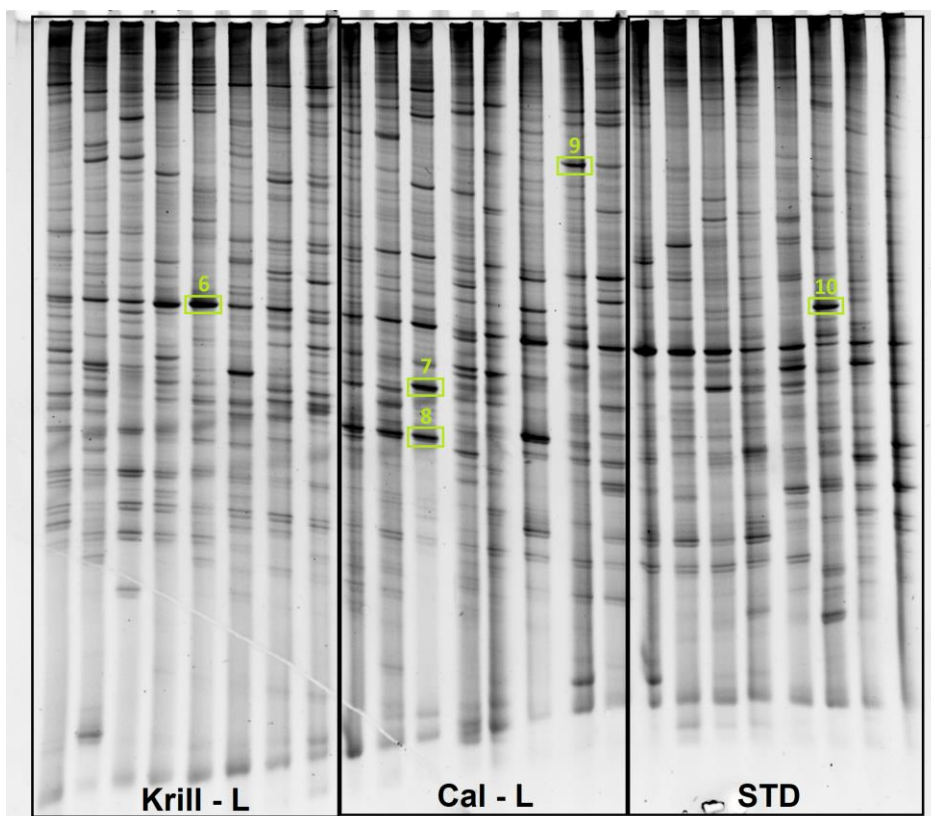
Dieta	Číslo vzorku	Trakt	Číslo myši	Koncentrace izolované DNA (ng/ul)	Hmotnost myši (g)
Cal – L	5	colon	22	83,3	38,1
	11	colon	14	88,9	37,8
	16	colon	46	70	44,5
	21	colon	40	48,6	36,9
	27	colon	2	72,5	44,1
	32	colon	3	185,5	41,5
	37	colon	28	80,4	44,0
	43	colon	1	97	38,1

### 4.3 PCR-DGGE

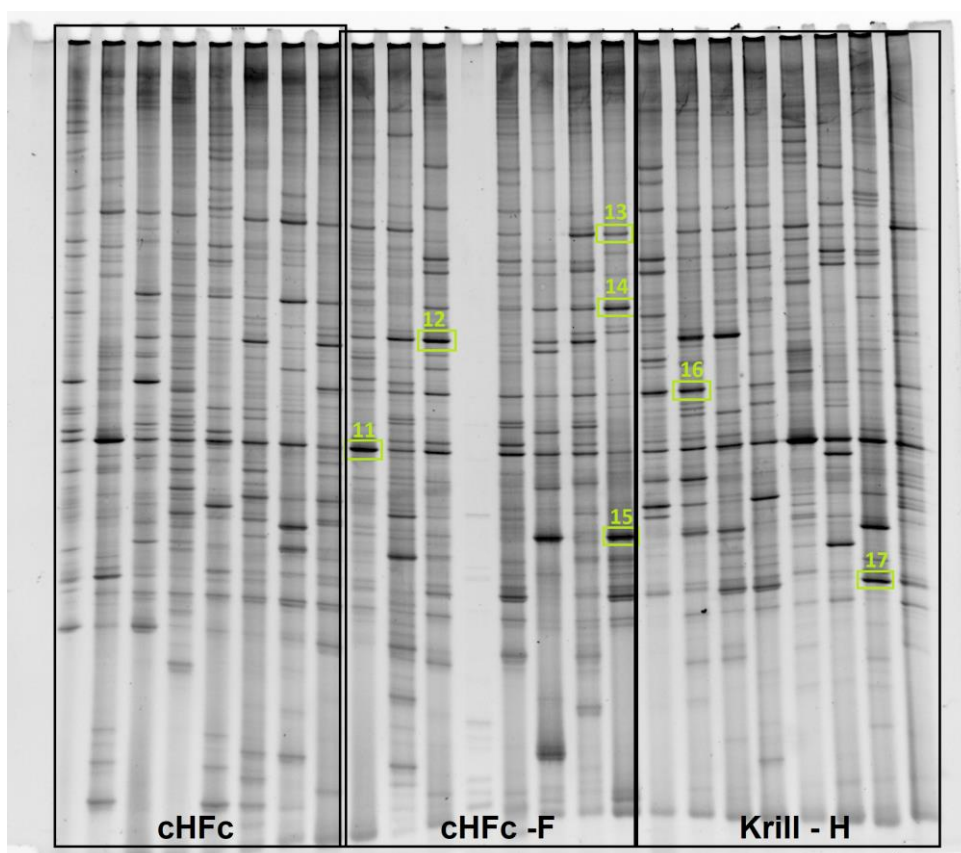
Na následujících obrázcích 4.2, 4.3, 4.4 a 4.5 jsou vyfocené DGGE gely se všemi vzorky (caecum i colon). Vzorky na gelech jsou rozdělené podle diet. Z každého gelu bylo vybráno několik významných úseků (bandů; zeleně označené) pro další analýzu. Celkem bylo vybráno 22 úseků. Postup při analýze a výběr úseků je popsán v kapitole 3.6 Stanovení mikrobiální diverzity metodou PCR-DGGE.



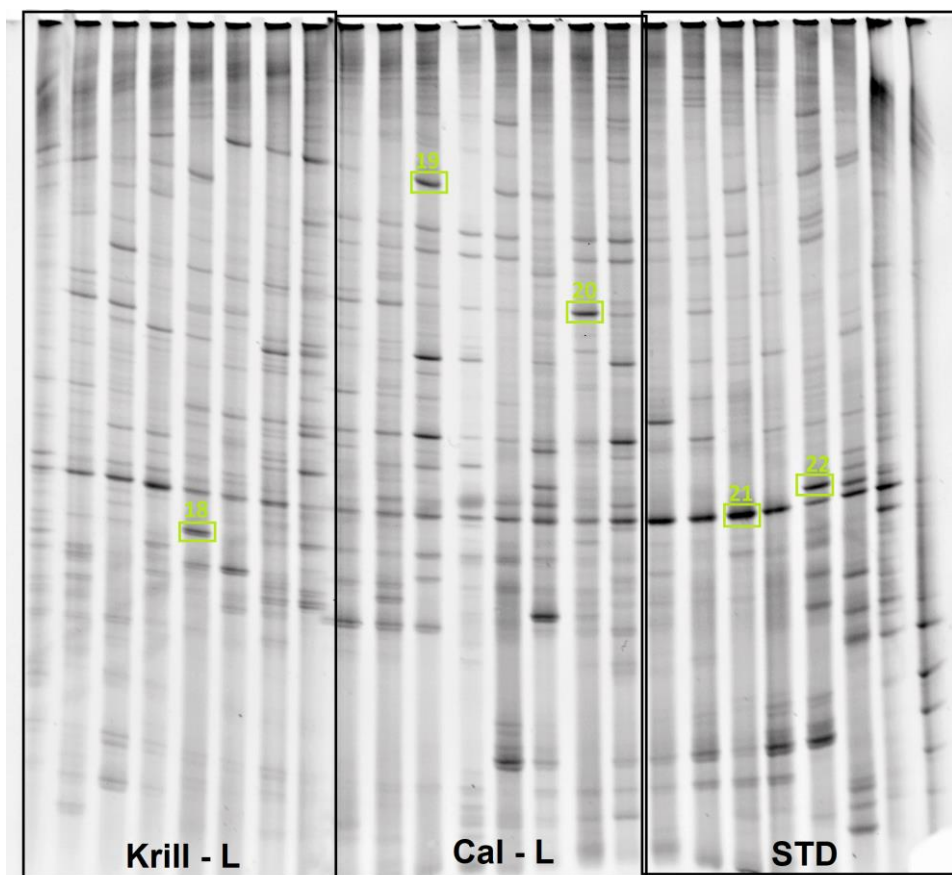
Obrázek 4.2: Caecum – DGGE gel pro diety cHFc, cHFc – F a Krill – H



Obrázek 4.3: Caecum – DGGE gel pro diety Krill – l, Cal – L, STD



Obrázek 4.4: Colon – DGGE gel pro diety cHFc, cHFc – F a Krill – H



Obrázek 4.5: Colon – DGGE gel pro diety Krill – L, Cal – L, STD

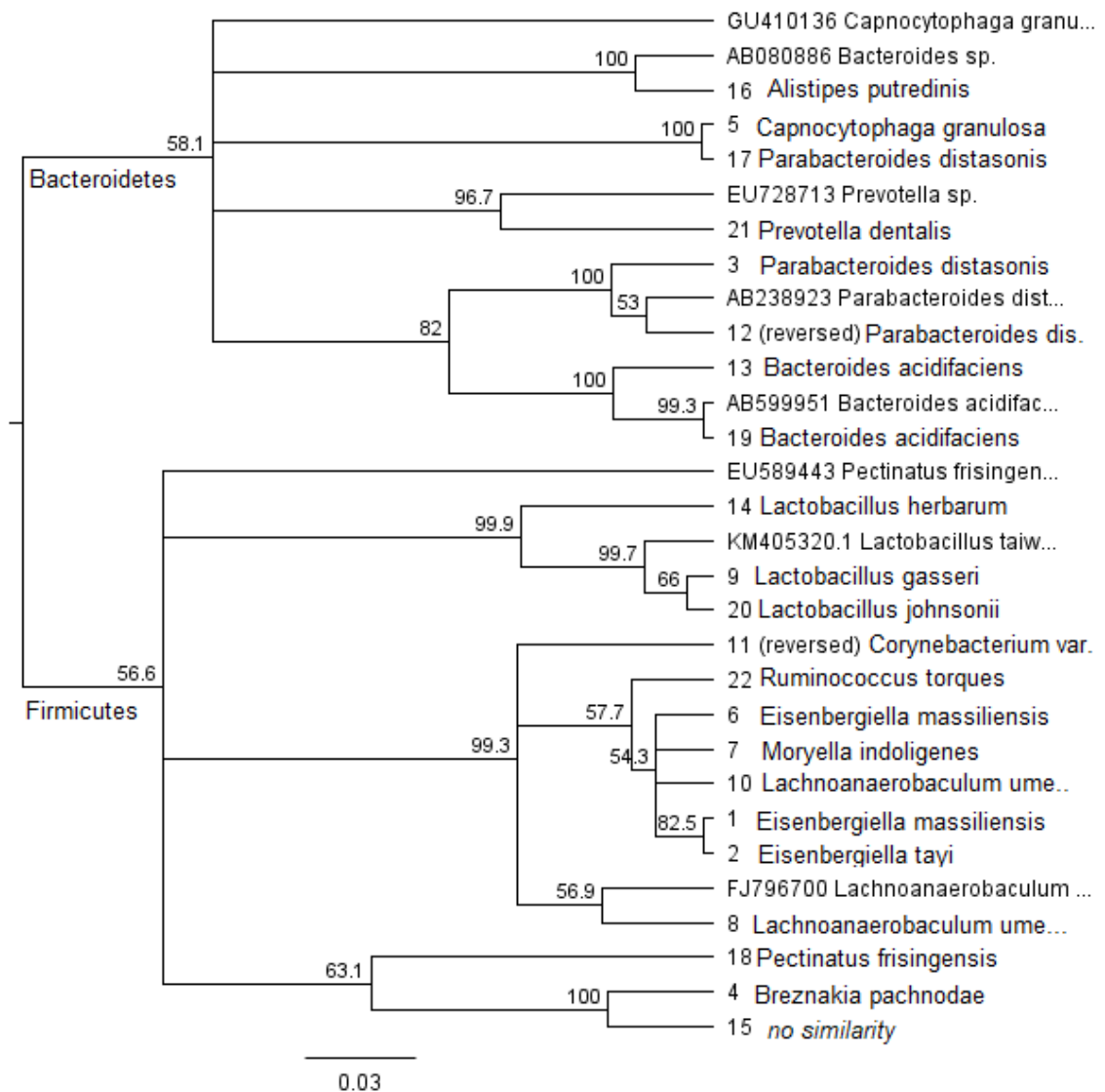
Do tabulky 4.3 jsou zaneseny databázi NCBI přiřazené druhy bakterií, 4. sloupec zobrazuje shodu sekvence ze Sangerova sekvenování s databází.

Tabulka 4.3: Bakterie zjištěné na základě podobnosti sekvencí ze Sangerova sekvenování a databáze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Číslo vzorku (bandu)	Identifikace	Taxonomie	Shoda (%)	Orgán	Zařazení úseku do diety
1 = 6	<i>Eisenbergiella massiliensis</i>	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae	99	cae.	cHFC
2	<i>Eisenbergiella tayi</i>	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae	99	cae.	cHFC
3	<i>Parabacteroides distasonis</i>	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae;	94	cae.	cHFc-F
4	<i>Breznakia pachnodae</i>	Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae;	81	cae.	cHFc-F

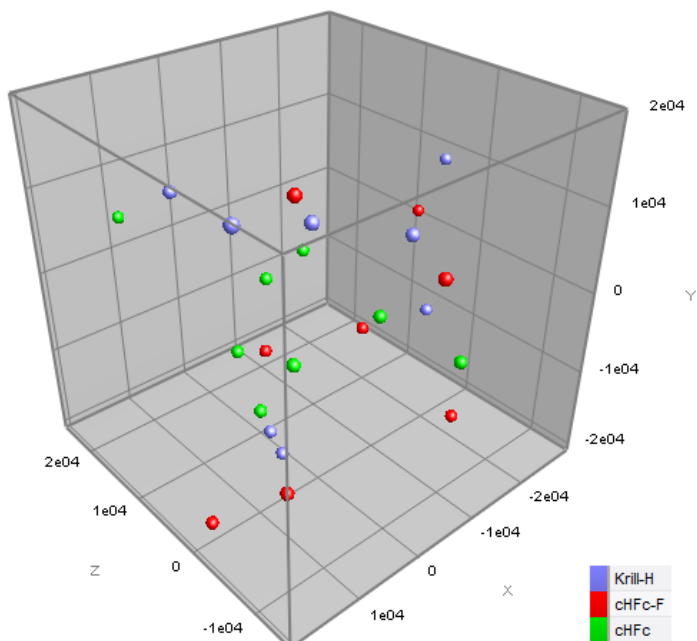
Číslo vzorku (bandu)	Identifikace	Taxonomie	Shoda (%)	Orgán	Zařazení úseku do diety
5	Capnocytophaga granulosa	Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae;	97,1	cae.	Krill-H
6 = 1	Eisenbergiella massiliensis	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae;	99	cae.	cHFC
7	Moryella indoligenes	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae;	99	cae.	CaL-L
8	Lachnoanaerobaculum umeaense	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae;	92	cae.	CaL-L
9	Lactobacillus gasseri	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;	94,9	cae.	CaL-L
10	Lachnoanaerobaculum umeaense	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae;	97	cae.	STD
11	Corynebacterium variabile	Bacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Corynebacteriaceae;	88,2	col.	cHFc-F
12	Parabacteroides distasonis	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae;	98	col.	cHFc-F
13 = 19	Bacteroides acidifaciens	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae;	89,6	col.	cHFc-F
14	Lactobacillus herbarum	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;	93	col.	cHFc-F
15	žádná podobnost			col.	cHFc-F
16	Alistipes putredinis	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae;	91	col.	Krill-H
17	Parabacteroides distasonis	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae;	85	col.	Krill-H
18	Pectinatus frisingensis	Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae	95	col.	Krill-L
19 = 13	Bacteroides acidifaciens	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae;	100	col.	CaL-L
20	Lactobacillus johnsonii	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;	97	col.	CaL-L
21	Prevotella dentalis	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae;	96	col.	STD
22	[Ruminococcus] torques	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae;	94	col.	STD

V softwaru Geneious byl vytvořen fylogram (obrázek 4.6). Kvůli přehlednosti byly do fylogramu přidány některé druhy bakterií.

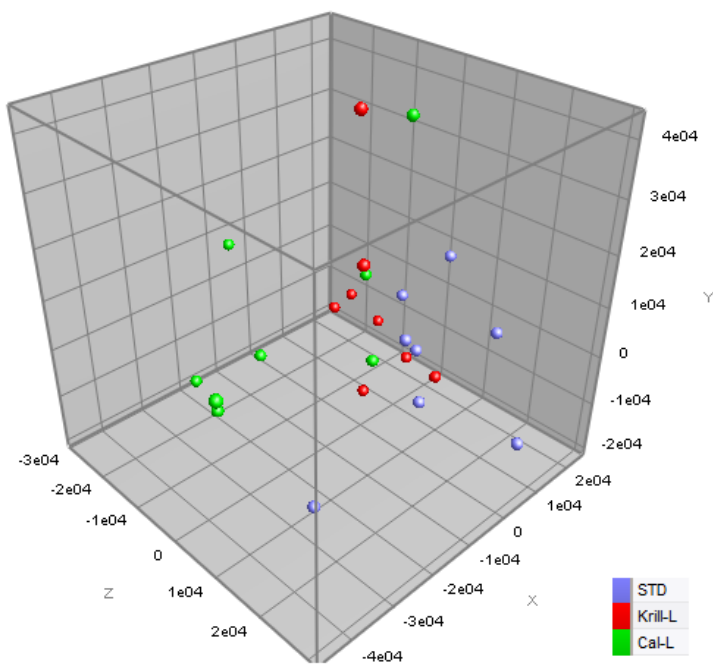


Obrázek 4.6: Fylogram vytvořený v programu Geneious

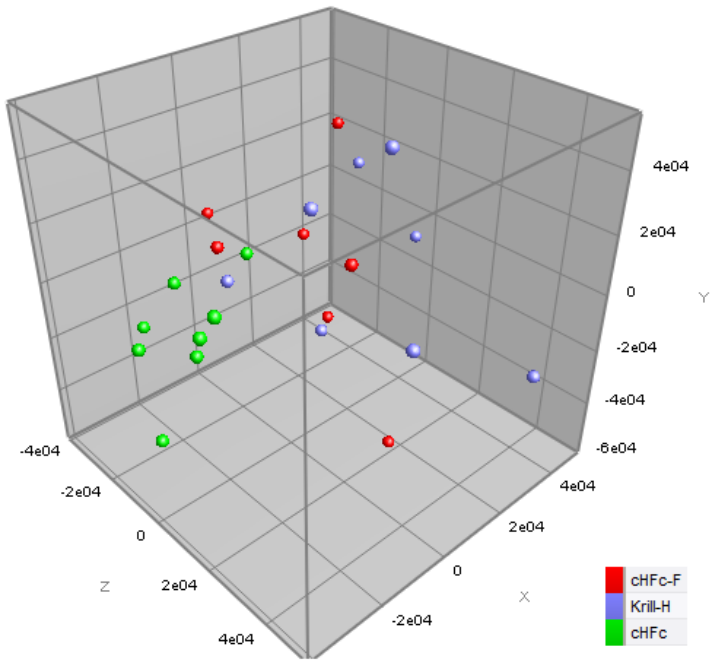
Na obrázcích 4.7, 4.8, 4.9 a 4.10 jsou PCA analýzy vytvořené v programu BioNumerics (<http://www.applied-maths.com/bionumerics>).



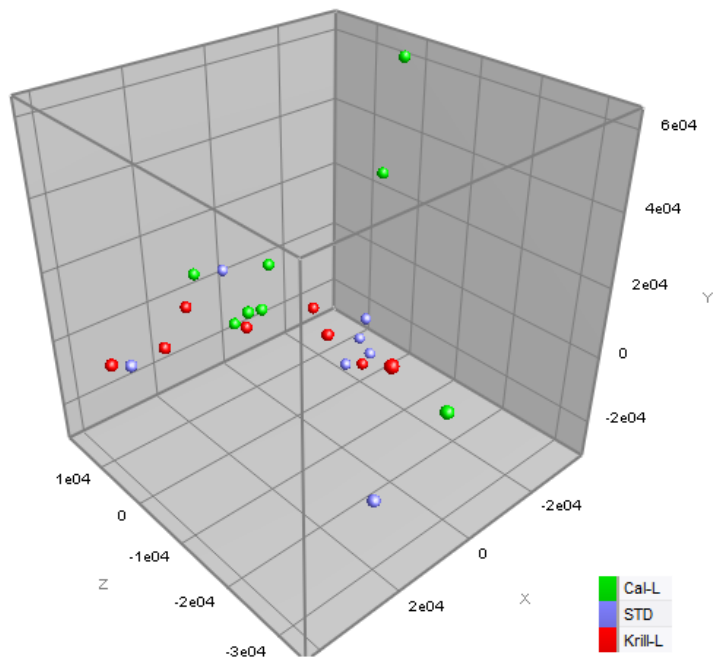
Obrázek 4.7: PCA analýza pro caecum: cHFc, cHFc – F, Krill – H



Obrázek 4.8: PCA analýza pro caecum: Krill – L, Cal – L, STD



Obrázek 4.9: PCA analýza pro colon: cHFc, cHFc – F, Krill – H



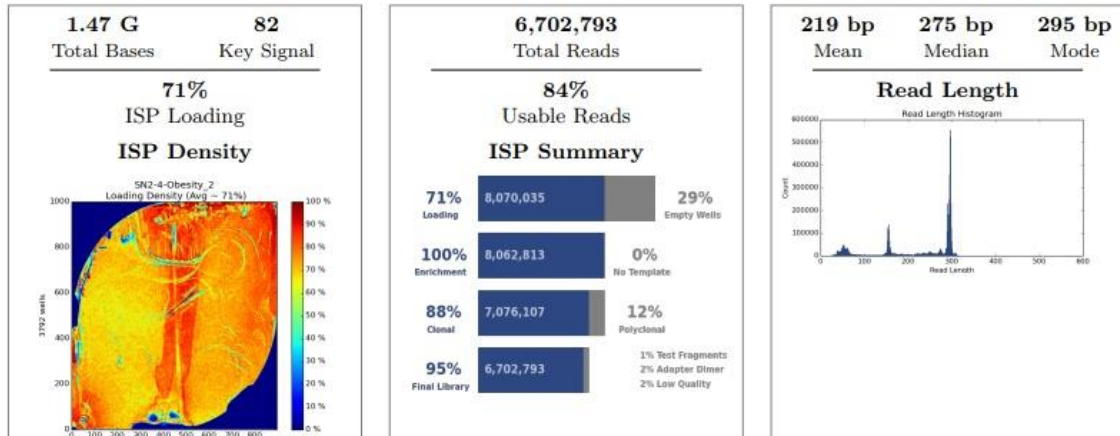
Obrázek 4.10: PCA analýza pro colon: Krill – L, Cal – L, STD



## 4.4 NGS

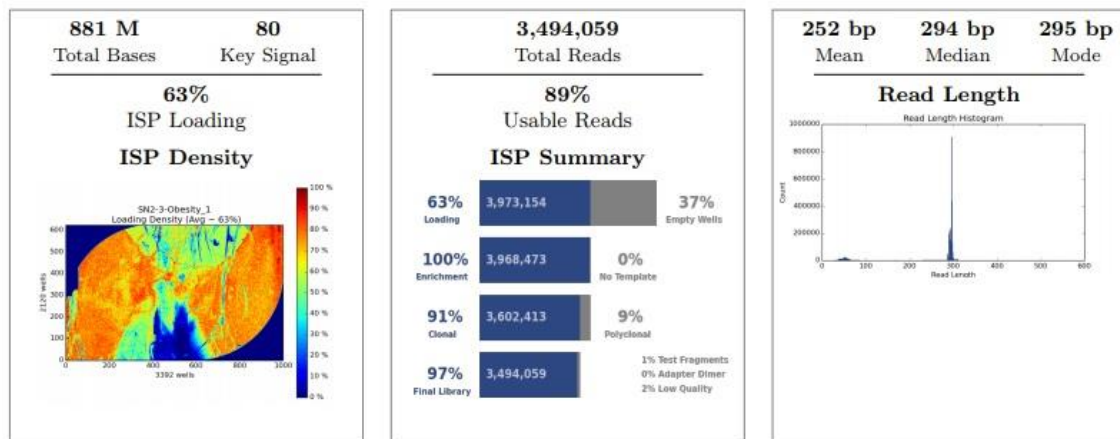
Na následujících obrázcích 4.11 a 4.12 jsou detaily proběhlé NGS analýzy: zleva procentuální obsazení čipu sekvencemi, počet sekvencí a jejich délka.

### Run Summary



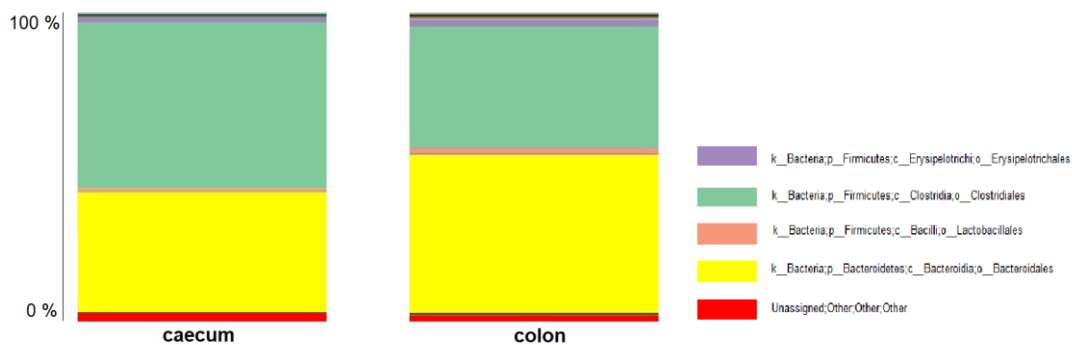
Obrázek 4.11: Informace o průběhu NGS pro caecum

### Run Summary



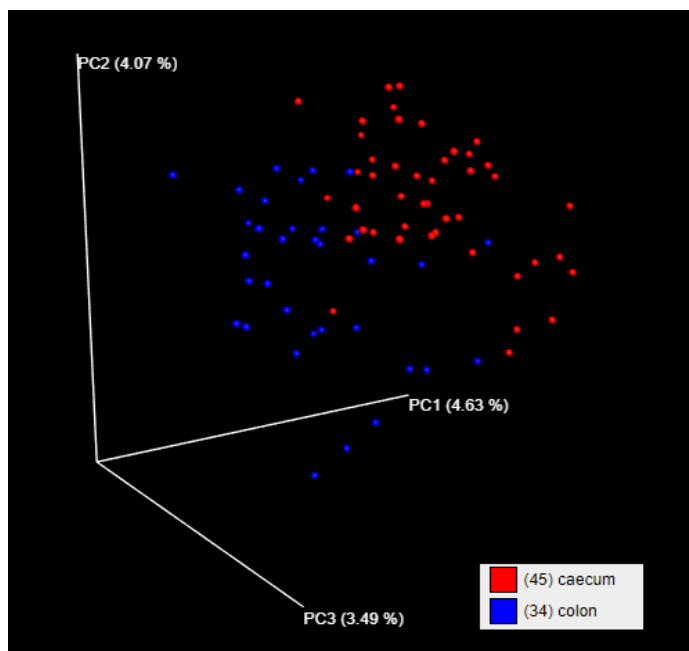
Obrázek 4.12: Informace o průběhu NGS pro colon

Na obrázku 4.13 je znázorněn sloupcový graf ukazující procentuální zastoupení jednotlivých řádů bakterií pro caecum a pro colon. Poměr Firmicutes a Bacteroidetes se mezi oběma trakty výrazně liší. Pro caecum je celkové procento Firmicutes 56,6 % a Bacteroidetes 38,8 %. Pro colon je celkové procento Firmicutes 43,6 % a Bacteroidetes 51,4 %. Zbylá procenta se bohužel nepodařilo identifikovat. V mikrobiálním složení colonu je patrné výraznější zastoupení řádu Lactobacillales (Firmicutes).



Obrázek 4.13: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni řádu u caeca a colonu

Obrázek 4.14 ukazuje PCoA analýzu. Základním výstupem je čtvercová matice, kde je určena rozdílnost mezi jednotlivými vzorky [73].

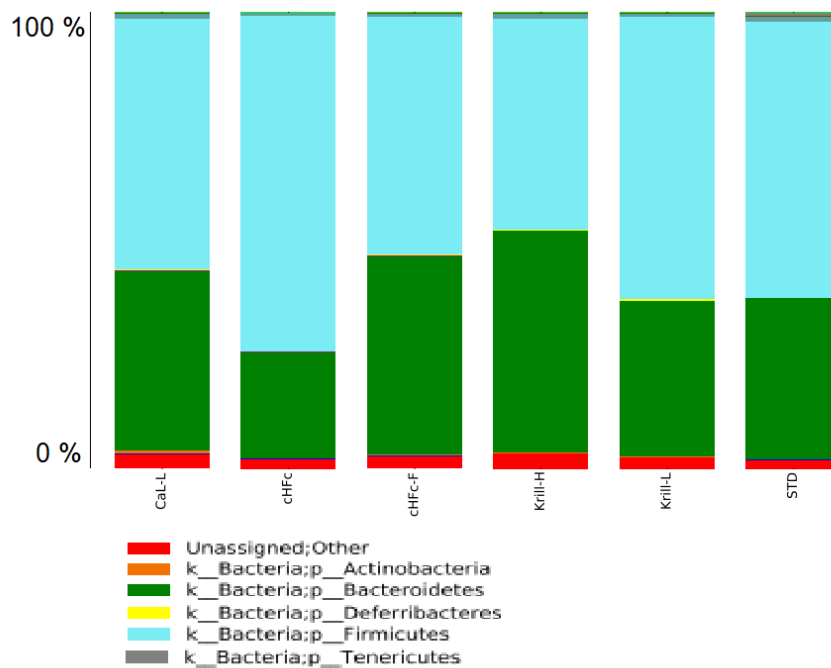


Obrázek 4.14: Nevážená analýza PCoA pro colon i caecum

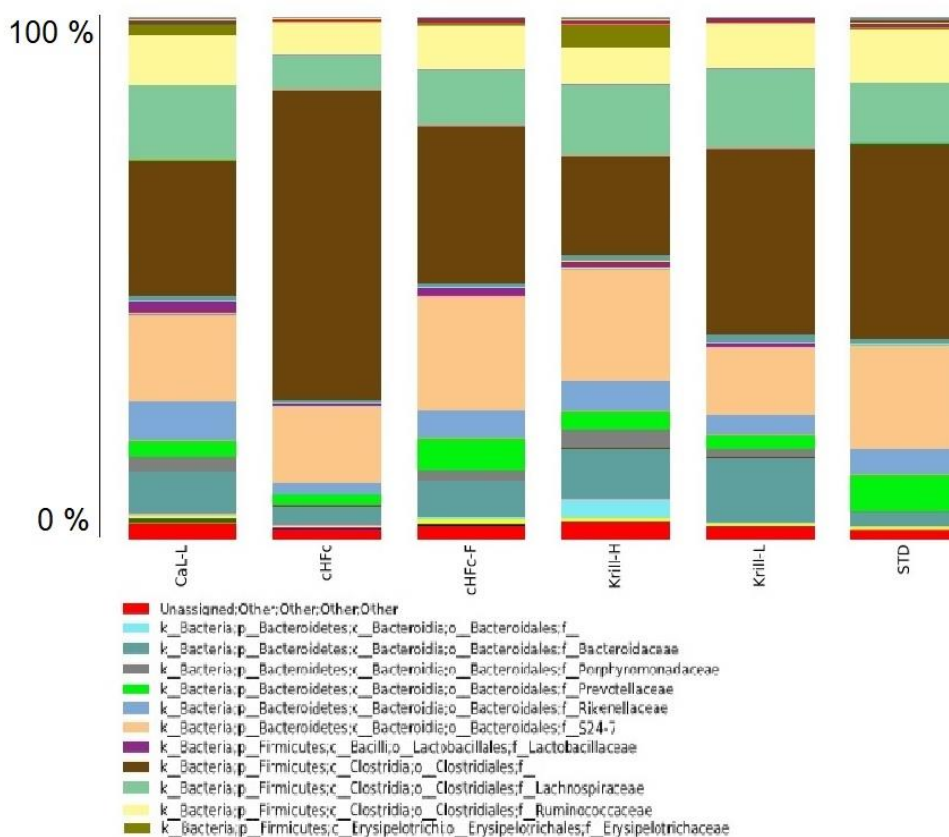
Z obou obrázků je patrné, že složení mikrobiomu caeca a colonu se liší, proto byly všechny další analýzy prováděny zvlášť.

#### 4.4.1 Caecum

V této kapitole jsou zobrazeny výsledné grafy získané analýzou QIIME (kapitola 3.7 Stanovení mikrobiální diverzity metodou NGS) pro caecum. Následující graf (obrázek 4.15) ukazuje procentuální zastoupení jednotlivých kmenů bakterií. Obrázek 4.16 zobrazuje rozdělení do čeledí nebo řádů bakterií pro caecum. Vzorky byly rozděleny podle diet popisovaných v kapitole 3.1.1 Experimentální diety. Poměr bakterií kmene Firmicutes a Bacteroidetes (obrázek 4.15) se mění v závislosti na dietě, stejně tak jako zastoupení jednotlivých čeledí bakterií (obrázek 4.16).

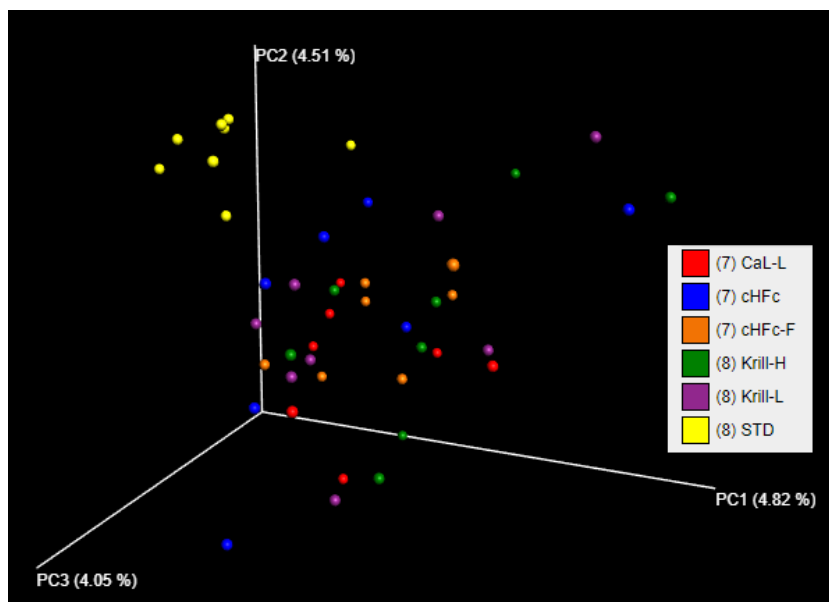


Obrázek 4.15: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni kmene u caeca. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.



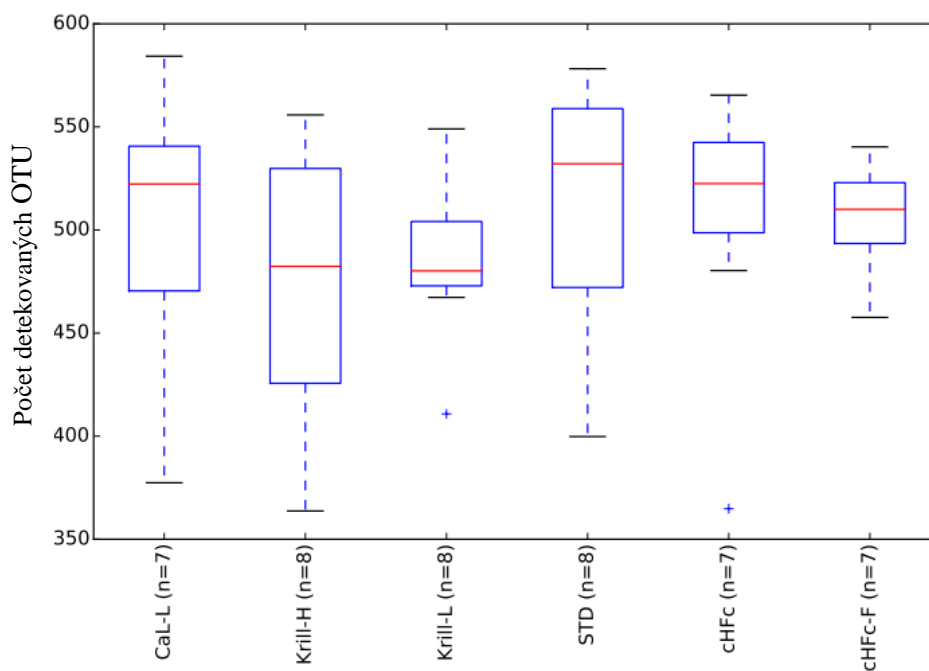
Obrázek 4.16: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni čeledi u caeca. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.

Na obrázku 4.17 vidíme neváženou PCoA analýzu, která zobrazuje vztahy mezi jednotlivými mikrobiomy na základě beta diverzity. Vzorky byly barevně rozlišeny podle druhu diety. Žluté kuličky představují myší modely se standardní nízkotučnou dietou, je možné pozorovat jejich shlukování a oddělení od ostatních vzorků.



Obrázek 4.17: Nevážená analýza PCoA pro caecum

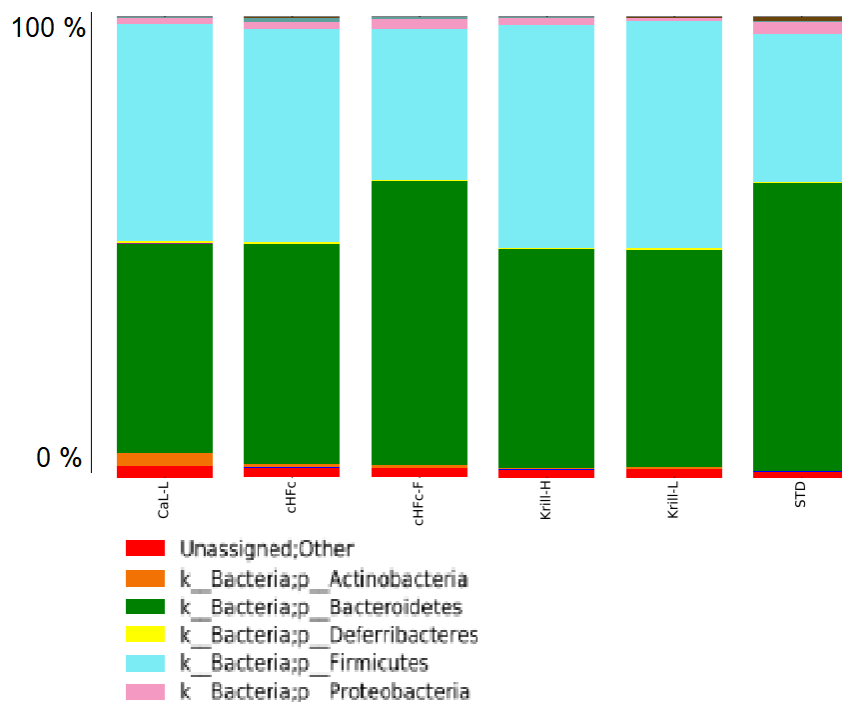
Obrázek 4.18 zobrazuje krabicové grafy (boxplots) určující bakteriální diverzitu pro vzorky z caeca (počet detekovaných OTU). Graf je opět rozdělen podle diet.



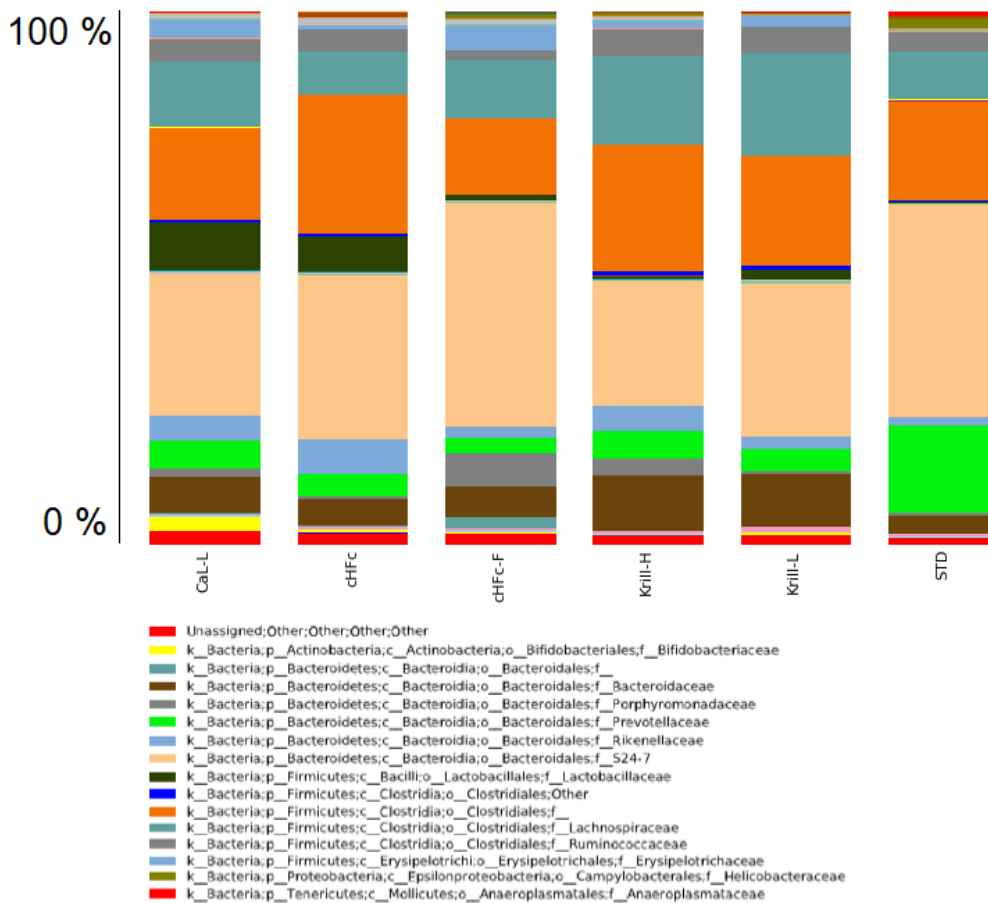
Obrázek 4.18: Caecum: znázornění bakteriální diverzity

## 4.4.2 Colon

V této kapitole jsou vyobrazeny výsledné grafy získané analýzou QIIME (kapitola 3.7 Stanovení mikrobiální diverzity metodou NGS) pro colon. Následující graf (obrázek 4.19) zobrazuje procentuální zastoupení jednotlivých kmenů bakterií. Obrázek 4.20 naznačuje rozdělení do čeledí nebo řádů bakterií pro colon. Vzorky byly rovněž rozděleny podle diet popisovaných v kapitole 3.1.1 Experimentální diety. Poměr bakterií kmene Firmicutes a Bacteroidetes (obrázek 4.19) se, stejně jako u caeca, mění v závislosti na dietě, mění se tak i zastoupení jednotlivých čeledí bakterií (obrázek 4.20).

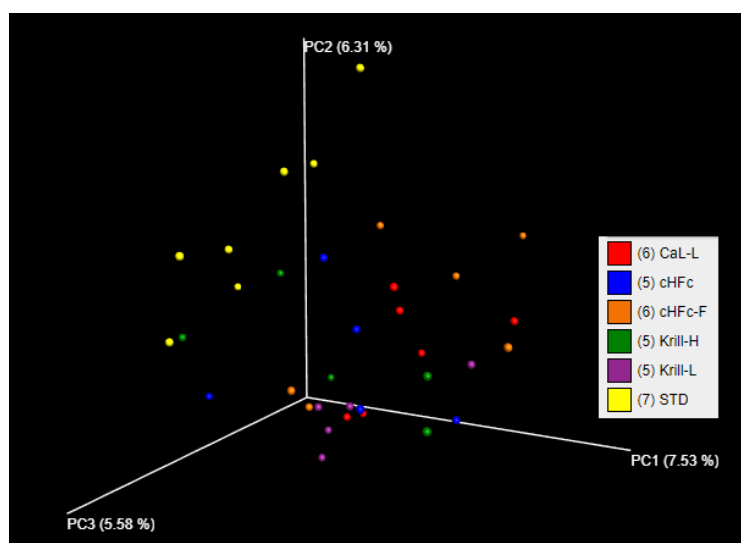


Obrázek 4.19: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni kmene u colonu. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.



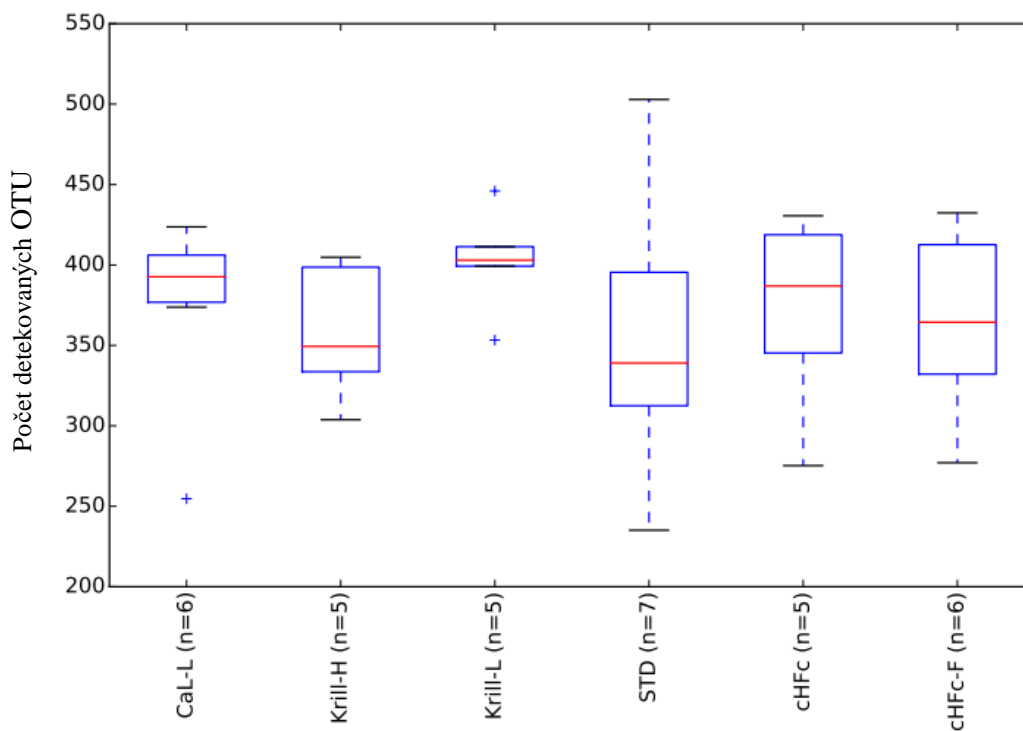
Obrázek 4.20: Sloupcový graf znázorňující mikrobiální diverzitu na úrovni čeledi u colonu. Každý sloupec zastupuje vzorky jedné diety.

Obrázek 4.21 ukazuje neváženou PCoA analýzu pro colon zobrazující vztahy mezi jednotlivými mikrobiomy na základě beta diverzity. Vzorky byly také barevně rozlišeny podle druhu diety. Žluté kuličky představují myší modely se standardní nízkotučnou dietou, stejně jako u caeca je možné pozorovat jejich shlukování a oddělení od ostatních vzorků.



Obrázek 4.21: Nevážená analýza PCoA pro colon

Obrázek 4.22 zobrazuje krabicové grafy (boxplots) určující bakteriální diverzitu pro vzorky z colonu (počet detekovaných OTU). Graf je opět rozdělen podle diet.



Obrázek 4.22: Colon: znázornění bakteriální diverzity

## 5 Diskuse

### Tělesná hmotnost

Samci kmene C57BL/6N byli ve věku 12 týdnů převedeni na experimentální výživu, popsanou v kapitole 3.1.1 Experimentální diety, která byla myším podávána po dobu 8 týdnů. Na konci experimentu byly všechny myši zváženy. Podle očekávání měly nejnižší hmotnost myši se standardní nízkotukovou dietou založenou především na sacharidech. Průměrná tělesná hmotnost těchto myší byla 29,8 g, průměrná hmotnost jedinců s vysokotukovou dietou cHFc 44,2 g. Zbylým 4 skupinám byly k vysokotukové dietě dodávány doplňky stravy ve formě omega-3 mastných kyselin, které redukovaly zvyšování hmotnosti. Nejlepších výsledků (tj. nejmenší přibývání na váze) bylo dosaženo podáváním vyšších dávek omega-3 kyselin ve fosfolipidové formě. Myši s dietou Krill-H měly po standardech druhou nejnižší průměrnou hmotnost (34,8 g) a myši s přídatkem rybího oleje měly průměrnou hmotnost vyšší (39,8 g). Což se shodovalo s experimentem [65], kde bylo dosaženo lepších výsledků při použití omega-3 mastných kyselin ve formě fosfolipidů než ve formě triglyceridů. Myši s obezogení dietou doplněnou o olej Calanus měly na konci experimentu průměrnou hmotnost 40,7 g. Příklad nízké dávky oleje z krillu k obezogení dietě měl na zpomalení přírůstku hmotnosti nejmenší vliv, myši průměrně vážily 43,6 g.

### Vzorky a DNA

V první části práce jsme izolovali mikrobiální DNA z fekálních vzorků (z caeca a colonu) myšího kmene C57BL/6N pomocí komerční sady QIAamp® PowerFecal® DNA Kit. Koncentrace DNA ve všech izolovaných vzorcích byla dostatečná pro další použití, hodnoty se pohybovaly mezi 32 ng/μl a 208 ng/μl.

Ve studii [75] bylo porovnáno několik způsobů extrakce DNA z fekálních vzorků. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím rozbíjecího aparátu. Tento mechanismus jsme použili v našem experimentu, izolace s využitím přístroje FastPrep (MP Bio) je popsána v kapitole 3.3 Izolace DNA.

### PCR-DGGE

Dále jsme provedli DGGE analýzu amplikonů oblasti genu 16S rRNA. Vybrané úseky (bandy) jsme vyřízli a poslali společnosti SEQme, aby vzorky osekvenovala. Při vizuální studii gelů nebyly mezi jednotlivými dietními skupinami pozorovány velké rozdíly ve složení mikrobiomu, avšak je možné sledovat mírné rozdíly v kvantitě bakteriální DNA. Rozdíly byly patrné i v rámci skupin. U gelů pro vzorky z caeca je možné pozorovat výraznou linii (úsek číslo 1 a 6), blíže byl určen jako gen charakteristický pro bakterie čeledi Lachnospiraceae, u gelů se vzorky z colonu se podařilo identifikovat jednu linii čeledi Bacteroidaceae (úseky 13 a 19). Taxonomické zařazení jsme získali



porovnáním dat ze sekvenátoru s databází NCBI. Sestavili jsme tabulku nejpravděpodobnějších zástupců, kteří odpovídají vybraným úsekům (bandům) a v programu Geneious jsme ze sekvencí sestavili fylogram (obrázek 4.6). Z jeho analýzy je patrné, že dominantními kmeny bakterií jsou Firmicutes a Bacteroidetes, což odpovídá standardnímu složení mikrobiálního traktu [7]. U jednoho vzorku se bohužel nepodařilo určit druh bakterie, ale byl zařazen mezi Firmicutes.

Při studiu shlukových analýz (obrázek 4.7 – 4.10) bylo znatelné clustrování mikrobiomu diety Cal-L a standardní nízkotukové diety (STD) u caeca (obrázek 4.8), kde je viditelné oddělení těchto dvou skupin. Separaci naznačují i skupiny cHFc a Krill-H u colonu (obrázek 4.9).

## NGS

Při NGS analýze pro caecum bylo pokrytí čipu 71 % (obrázek 4.11). Bylo získáno celkem 8 070 035 sekvencí, k další analýze pokračovalo 8 062 813 a 12 % z nich bylo polyklonálních, proto byly vyřazeny spolu s dalšími sekvencemi s nízkou kvalitou. Celkový počet sekvencí, které jsme analýzou NGS získali, byl 6 702 793. Na histogramu je zobrazena délka fragmentů. Většina z nich je dlouhá cca 300 pb, ale objevily se i nespecifické fragmenty o délce kolem 50 a 150 pb, které ale spadají do vyřazených. Pravděpodobně vznikly při PCR reakci, kdy došlo k amplifikaci nespecifických produktů.

Při zpracování vzorků colonu byl čip obsazen sekvencemi z 63 % (obrázek 4.12), což odpovídá navázání 3 973 154 sekvencím. K další analýze šlo 3 968 473 sekvencí. Z nich bylo 9 % polyklonálních a tyto sekvence byly vyřazeny, stejně jako v dalším kroku 2 % sekvencí nízké kvality. Celkový počet získaných sekvencí byl 3 494 059. Histogram popisuje délku fragmentů, která byla stejně jako u caeca cca 300 pb, ale nevyskytovaly se zde nespecifické produkty.

Složení mikrobiomu colonu a caeca u všech živočichů se zásadně liší, v tenkém a částečně i ve slepém střevě mohou být zbytky kyslíku, tudíž se zde vyskytují i aerotolerantní bakterie, na rozdíl od tlustého střeva, kde je převaha anaerobních. Nejhojněji zastoupený řád bakterií v caecu, bez ohledu na experimentální dietu, byly Clostridiales (Firmicutes) s necelými 54 %, druhý vysoce zastoupený řád byl Bacteroidales (Bacteroidetes) a dosahoval téměř 39 %. V colonu se poměr těchto dvou hlavních řádů otočil, vyšší zastoupení (51,3 %) měl řád Bacteroidales oproti Clostridiales (39 %). Bifidobakteria (Actinobacteria) se vyskytovaly v 0,15 % u caeca a u colonu byla jejich hladina o 0,3 % vyšší. Lišilo se i zastoupení řádu Lactobacillales (Firmicutes), u caeca 1 %, u colonu 2 %. Tyto poznatky jsou v souladu s dosud publikovanými daty [12].

Z nevážené PCoA analýzy na obrázku 4.14 jasně vyčteme, že mikrobiom caeca se výrazně odlišuje od mikrobiomu colonu. Z těchto důvodů jsme další analýzy prováděli pro každý trakt zvlášť.

## Caecum

Se změnou diety ze standardní nízkotukové na vysokotukovou cHFc dietu došlo v caecu, kde u myši probíhá fermentace, ke změně kompozice hlavních bakteriálních kmenů, Firmicutes a Bacteroidetes (obrázek 4.15). Obezita je zde spojena se zvýšením relativního zastoupení Firmicutes a odpovídajícímu poklesu Bacteroidetes, což je v souladu s dalšími studii [12, 18, 8, 23]. Podle Nguyena a spol. [12] je posun v poměrech způsoben změnami na nižší taxonomické úrovni kmene Bacteroidetes, kde dochází ke snížení hladiny rodů *Prevotella* a *Roseburia* na úkor zvýšení rodů *Bacteroides*, *Alistipes* a *Barnesella*. Tyto poznatky jsme pozorovali i v našem experimentu a budou popsány níže.

Myši se standardní dietou měly v průměru 60,4 % bakterií kmene Firmicutes a 35,4 % kmene Bacteroidetes, přechodem na vysokotukovou dietu se relativní počet bakterií kmene Firmicutes zvýšil na 73,6 % a Bacteroidetes se snížily na 23,2 %. Potravinové doplňky ve formě omega-3 kyselin ovlivnily zastoupení zmíněných dvou základních kmenů. Všechny způsobily nárůst relativních počtů bakterií kmene Bacteroidetes, čímž mikrobiom přiblížily ke složení mikrobiomu standardních myši. Standardnímu mikrobiomu se složením nejvíce podobal mikrobiom jedinců s dietou Krill-L. Změna mikrobiomu směrem ke štíhlým myším ale neodpovídala fenotypovým změnám, protože myši s touto dietou vážily v průměru 43,6 g, což je téměř srovnatelné s váhou obézních myši s vysokotukovou dietou bez doplňků. Nejvyšší nárůst hladiny Bacteroidetes na úkor Firmicutes bylo pozorováno u obezogení diety s přídatkem vysoké dávky oleje z krillu (Krill-H), kdy relativní četnost kmene Bacteroidetes přesáhla i myši se STD dietou. Tato změna mikrobiomu korelovala s fenotypovou změnou, kdy myši dosahovaly nejnižších hmotností v rámci obezogeních diet (průměrně 34,8 g). To souhlasí se studií [65], kdy nejnižších váhových přírůstků při obezogení dietě dosahovaly myši, kterým byly podávány omega-3 mastné kyseliny ve fosfolipidové formě. Myši s vysokotukovou dietou s přídatkem rybího oleje (cHFc-F) a myši s dietou s olejem Calanus (Cal-L) měly srovnatelně zvýšenou hladinu kmene Bacteroidetes, fenotypově se také podobaly. Olej Calanus ale pravděpodobně působí kladně na bakterie kmene Actinobacteria, součást probiotik, jejichž relativní četnost se zvýšila z 0,1 % na 0,84 %. Existují ale názory, že Actinobacteria nemusí být sekvenováním genu 16S rRNA rozpoznány [23].

Bakteriální složení v caecu na úrovni čeledi je na obrázku 4.16. Nejvýraznější změna mezi složením mikrobiomu myši s STD a cHFc dietou je patrná u bakterií řádu Clostridiales (Firmicutes, tmavě hnědá). Bakterii se bohužel nepodařilo dále klasifikovat. Důvodem může být chyba v sekvenaci nebo se může jednat o neklasifikovaný typ bakterií. Vysokotuková dieta způsobuje dramatické zvýšení komunity Clostridiales (z 34,7 % (STD) na 59,2 % (cHFc) na úkor čeledi Lachnospiraceae (kmen Firmicutes), jejichž zastoupení bylo u cHFc jen 6,6%. Omega-3 kyseliny způsobily snížení hladiny blíže neklasifikovaných Clostridiales. Další změny byly pozorovány u bakterií S24-7

(Bacteroidetes), které patří mezi nekultivované čeledi představující podstatnou složku myší mikrobiální komunity. Podle publikace [76] se jedná o fermentační anaerobní bakterie podobné čeledi Bacteroidales. Další pozorovaná změna je u bakterií čeledi Bacteroidaceae (kmen Bacteroidetes, rod *Bacteroides*), kde vysokotuková dieta zastoupení těchto jedinců zvýšila (odpovídá [12]), ještě vyšší nárůst byl pozorován u diet s olejem z krillu, a to až na 12,6 %. Naopak snížení v důsledku obezogenních diet se projevilo u bakteriální komunity čeledi Prevotellaceae (Bacteroidetes), což je v souladu s článkem [12], kde je uvedeno, že bakterie rodu *Prevotella* (čeleď Prevotellaceae) měly nižší zastoupení u obézních zvířat než u štíhlých. Tyto změny v bakteriální komunitě u myší souhlasí s humánními studiemi, kdy byla sledována vyšší hladina rodu *Bacteroides* (čeleď Bacteroidaceae) u lidí konzumujících dlouhodobě více tuků a bakterie rodu *Prevotella* převládaly u lidí konzumujících více sacharidů [12]. Avšak ani literatura není v tomto jednotná. Autoři [77] uvádějí, že u obézních jedinců byly sledovány vyšší hladiny bakterií čeledi Prevotellaceae v porovnání s protějšky s normální hmotností.

Je důležité zmínit, že změny na úrovni bakteriálních kmenů nemusí korelovat se změnami taxonomického zařazení v rámci čeledi nebo rodu. To znamená, že při snížení počtu Bacteroidetes může dojít ke zvýšení počtu čeledi Bacteroidales (Bacteroidetes) [78]. Proto je na místě dále se zaměřit spíše na konkrétní čeledi, rody a druhy bakterií než porovnávat kmene mezi sebou [1].

PCoA analýza pro caecum (obrázek 4.17) ukazuje, že složení mikrobiomu caeca je více ovlivněno dietou než potravinovými doplňky, mikrobiom zvířat na standardní dietě (žluté body) se výrazně lišil od ostatních mikrobiomů na vysokotukové dietě. Dále jsme zde nepozorovali další výrazné shlukování.

Graf na obrázku 4.18 odráží celkovou diverzitu bakteriální populace a srovnává odlišnosti počtu OTU (počet bakteriálních druhů) v závislosti na dietách. Jak uvádí studie [8], mikrobiom obézních jedinců vykazuje nižší počet OTU, což je zde potvrzeno u myší s vysokotukovou dietou bez omega-3 doplňků. Nejvyšší diverzita byla pozorována u mikrobiomu myší se standardní dietou, dále ale také u myší s dietami Cal-L a Krill-H, z čehož vyplývá, že doplňky z oleje Calanus a z oleje z mořského krillu ve vyšší dávce působí pozitivně na rozmanitost a kompozici druhů v rámci mikrobiomu. U ostatních doplňků je rozpětí diverzity nižší. Vyšší počet OTU je považovaný za kladný znak, nicméně rozptýly u zvířat byly tak velké, že z toho nevyplývá žádná závislost.

## Colon

U mikrobiomu tlustého střeva byly viditelné menší rozdíly mezi jednotlivými dietami v poměru kmenů Firmicutes a Bacteroidetes (obrázek 4.19). U myší se standardní nízkotukovou dietou byla relativní četnost převládajícího kmene Bacteroidetes 62,5 % a kmene Firmicutes 32,3 %. Vysokotuková dieta i u colonu způsobila zmnožení bakterií

kmene Firmicutes, ale už zde nebyl patrný vliv potravinových doplňků, jako u caeca. Výjimku tvoří pouze přídavek ve formě rybího oleje, který posunul složení mikrobiomu zpět ke standardnímu. Nárůst můžeme pozorovat u zastoupení kmene Actinobacterií, který byl způsoben vysokotukovou dietou, a to z 0,1 % u STD na 0,8 % cHFc. Vyšší nárůst (na 2,83 %) byl zaznamenán u myši, kterým byla obezogení dieta doplněna olejem Calanus. Naopak snížení vlivem diety nastalo u Proteobacterií.

Při detailnějším pohledu na čeledi bakterií u mikrobiomu colonu (obrázek 4.20) můžeme zaznamenat změnu v zastoupení nekultivované čeledi S24-7. Vlivem vysokotukové diety se tato čeleď redukovala. Zdá se, že omega-3 kyseliny tuto redukci ještě podpořily, kromě oleje z mořských ryb, u kterého naopak došlo ke zmnožení bakterií nad rámec standardu, a to na úkor blíže neklasifikovaného řádu Clostridiales. Samotná obezogení dieta původně zastoupení řádu Clostridiales zvýšila, avšak doplňky měly tendenci k jeho snižování. Další výrazná změna způsobená konzumací diety s vyšším obsahem tuků je sledována čeledi Lactobalillaceae, kdy její relativní četnost stoupla z 0,2 % (STD) na 6,65 % (cHFc) a u Cal-L na 8,84 %. Rybí olej a olej z krillu zvýšení redukovaly. Podle Nguyen a spol. [12] mají obézní myši, jak bylo zmíněno výše, nižší zastoupení bakterií rodu *Prevotella* než myši štíhlé. Toto tvrzení je v souladu s našimi výsledky. Procentuální zastoupení čeledi Prevotellaceae (převážně rod *Prevotella*) kleslo ze 16,43% (STD) na 4,16 % (cHFc). Nejvyšší zpětný nárůst vlivem doplňků je sledován u diety Krill-H. S výše uvedenou literaturou souhlasí i naše výsledky u čeledi Bacteroidaceae, jejíž činnost se u cHFc diety oproti STD mírně zvýšila, omega-3 kyseliny ale tento nárůst ještě podpořily. Dále jsme zjistili, že přídavek ve formě oleje Calanus podporuje zmnožení Bifidobacterií.

I u colonu je podle PCoA analýzy složení mikrobiomu ovlivněno ve větší míře dietou než potravinovými doplňky (obrázek 4.21). Můžeme ale pozorovat větší rozdíly mezi jednotlivými mikrobiomy. Žluté body (standardní dieta) jsou zřetelně odděleny od ostatních. Je patrný rozdíl mezi mikrobiomem standardních myši a myši s vysokotukovou dietou s olejem Calanus (oranžové body). Dále je vidět odlišnost mezi standardní dietou a vysokotukovou dietou cHFc (modré body).

Krabicový graf pro mikrobiom colonu na obrázku 4.22 ukazující celkovou diverzitu bakteriální populace (počet detekovaných OTU) udává, že mikrobiomy myši se standardní dietou vykazovaly velké rozpětí druhů, zatímco přídavky bakteriální diverzitu snížily. Některé vzorky u colonu musely být vyřazeny z důvodu krátkých sekvencí DNA, proto je v grafu zahrnuto menší zastoupení mikrobiomu v rámci jednotlivých diet, což může snižovat statistickou významnost. Rozptyly u zvířat byly tak velké, že ani zde nevyplývá žádná závislost.

### **Srovnání metod PCR-DGGE a NGS**

Při srovnání výsledků získaných pomocí metod PCR-DGGE a NGS jsme zjistili, že většina čeledí detekovaných bakterií z PCR-DGGE souhlasí s výsledky z NGS. Silný

úsek (band) 21 u vzorků colonu (dieta STD) (obrázek 4.5) byl určen jako čeleď Prevotellaceae, která měla ve výsledcích NGS pro STD dietu u colonu relativní zastoupení 16,43 %, vyšší než ostatní diety. To potvrzuje i intenzita úseku. Další dominantní úsek vyskytující se u všech vzorků (úsek 1 a 6) byl u PCR-DGGE (obrázek 4.2 a 4.3) určen jako čeleď Lachnospiraceae, která byla v NGS zastoupena ve 13 % v caecu a 14,1 % colonu. U úseků, jejichž taxonomické zařazení podle databáze NCBI nekorelovalo se zařazením v softwaru QIIME, bylo 5. Důvodem mohlo být použití odlišných primerů v obou metodách. Každá zmíněná metoda vychází ze sekvenování jiného úseku genu 16S rRNA. Primery k PCR-DGGE byly navrženy roku 1993 [53] a k NGS roku 2014 [70], kdy bylo známo nebo lépe popsáno mnohem více bakterií. I přes to, že primery by měly být obecné pro všechny bakterie, nemusí být pomocí primerů k PCR-DGGE sekvenovány druhy bakterií, které v době vývoje metody nebyly známy. V současné době jsou tedy přesnější výsledky získané pomocí NGS.

## 6 Závěr

V současné době stále existuje mnoho úskalí ohledně porozumění vztahu mezi stravou, životním stylem, střevní mikroflórou a obezitou. Pro další identifikaci vzájemného vztahu obezity a střevního mikrobiomu je potřeba soustředit se například na lepší pochopení funkcí střevního mikrobiomu a jejich fyziologického významu pro obezitu, dále bude nutné analyzovat účinky dlouhodobých stravovacích návyků na mikrobiální populace ve střevech, pochopit vliv potravin, které mohou ohrozit integritu střevní sliznice, jež je považována za klíčovou pro celkový zdravotní stav a obezitu. Je důležité při dietě využívat potraviny, které udržují střevní sliznice neporušené, aby nedocházelo k zánětům střevní sliznice. V neposlední řadě bychom měli zjistit, jak na mikrobiom působí dlouhodobé podávání vitamínů, lék a dalších doplňků stravy, a jaký mají vliv na obezitu. Velmi důležité je i omezení užívání antibiotik.

Obezita je v celosvětovém měřítku zásadním problémem a k jejímu pochopení a léčbě by mělo být použito všech dostupných prostředků. Pro léčbu obezity se vědci po celém světě snaží používat nejnovější technologie. Je známo, že kromě zvýšení příjmu energie ze stravy existují i další faktory přispívající k obezitě. Na základě výše zmíněných skutečností je jasné, že lepší pochopení role mikrobiomu při obezitě by vedlo k možným řešením pro léčbu této poruchy. Protože jsou mikroorganismy střev schopné regulovat energii z potravy, zasahovat do genové exprese a měnit tělesnou hmotnost a adipozitu, je jedním z cílů současného výzkumu, aby mohl být normální stav obézních pacientů dosažen modifikací intestinálního mikrobiomu, i když to nemůže nahradit zdravou stravu a aktivní pohyb.

Ve své práci jsem užitím molekulárně biologických metod, jako je izolace DNA, amplifikace vybraných genů metodou PCR, qPCR, DGGE elektroforéza, Sangerova sekvenování nukleových kyselin a NGS, analyzovala a srovnávala střevní mikrobiomy myši s různými typy diet – nízkotukovou, vysokotukovou a vysokotukovou s potravinovými doplňky ve formě fosfolipidů a triglyceridů. Bylo zjištěno, že potravinové doplňky mají vliv na mikrobiom i na tělesnou hmotnost myši, došlo ke zlepšení parametrů obezity, čímž byla potvrzena první hypotéza. Dieta ovlivnila jak složení mikrobiomu (poměr bakteriálního kmenu Firmicutes a Bacteroidetes), tak jeho potravinové doplňky podávané spolu s obezogení dietou výrazněji změnilo mikrobiom směrem k mikrobiomu myši se standardní tělesnou hmotností. Tímto byla potvrzena i druhá hypotéza. Z mikrobiologického hlediska však nelze z použitých potravinových doplňků jednoznačně určit jeden konkrétní, který by byl nejlepší. Byly detekovány rozdíly, čímž jsme si ověřili, že se s hmotností mění i mikrobiom.

To nám dává potenciál k dalšímu výzkumu, kde bychom mohli modulací mikrobiomu terapeuticky řešit celosvětovou epidemii obezity.

## Seznam použité literatury

- [1] BAOTHMAN, Othman A., Mazin A. ZAMZAMI, Ibrahim TAHER, Jehad ABUBAKER a Mohamed ABU-FARHA. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2016, **15**(1), - [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1186/s12944-016-0278-4. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-016-0278-4>
- [2] DAVIS, Cindy D. The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutrition Today* [online]. 2016, **51**(4), 167-174 [cit. 2018-03-05]. DOI: 10.1097/NT.000000000000167. ISSN 0029-666X. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00017285-201607000-00003>
- [3] ČEJKOVÁ, Darina a David ŠMAJS. Projekt lidského mikrobiomu. *Universitas - revue Masarykovy univerzity*. Brno: Masarykova univerzita, 2010, **43**(2), 23-28. ISSN 1211-3387.
- [4] RICHARD A. HARVEY, PAMELA C. CHAMPE a BRUCE D. FISHER. *Microbiology*. 2. ed., 2. printing. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781782159.
- [5] JOVEL, Juan, Levinus A. DIELEMAN, Dina KAO, Andrew L. MASON a Eytan WINE. The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Metagenomics* [online]. Elsevier, 2018, s. 197-213 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/B978-0-08-102268-9.00010-0. ISBN 9780081022689. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081022689000100>
- [6] KNIGHT, Bob. *Poslouchej své břicho: Ohromný vliv mikrobů*. Bratislava: Noxi, s.r.o., 2016. ISBN 978-80-8111-364-2.
- [7] KHAN, Imran, Muhammad YASIR, Esam AZHAR, Taha KUMOSANI, Elie BARBOUR, Fehmida BIBI a Mohammad KAMAL. Implication of Gut Microbiota in Human Health. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* [online]. 2014, **13**(8), 1325-1333 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.2174/1871527313666141023153506. ISSN 18715273. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5273&volume=13&issue=8&spage=1325>
- [8] HARAKEH, Steve M., Imran KHAN, Taha KUMOSANI et al. Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2016, **6**, - [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00095. ISSN 2235-

2988. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2016.00095/abstract>

- [9] WILLEY, Joanne M., Linda. SHERWOOD a Christopher J. WOOLVERTON. *Prescott's microbiology*. Ninth edition. New York, NY: McGraw-Hill, 2014. ISBN 9780073402406.
- [10] KASSELMAN, Lora J., Nicholas A. VERNICE, Joshua DELEON a Allison B. REISS. The gut microbiome and elevated cardiovascular risk in obesity and autoimmunity. *Atherosclerosis* [online]. 2018, **271**, 203-213 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.036. ISSN 00219150. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915018301138>
- [11] NIE, Ying, Feijun LUO a Qinlu LIN. Dietary nutrition and gut microflora: A promising target for treating diseases. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2018, **75**, 72-80 [cit. 2018-03-12]. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.03.002. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224416303259>
- [12] NGUYEN, T. L. A., S. VIEIRA-SILVA, A. LISTON a J. RAES. How informative is the mouse for human gut microbiota research?. *Disease Models & Mechanisms* [online]. 2015, **8**(1), 1-16 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1242/dmm.017400. ISSN 1754-8403. Dostupné z: <http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.017400>
- [13] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005. ISBN 8072546864.
- [14] BOWCUTT, Rowann. Heterogeneity across the murine small and large intestine. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(41), 15216- [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.3748/wjg.v20.i41.15216. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i41/15216.htm>
- [15] KAMADA, Nobuhiko, Sang-Uk SEO, Grace Y. CHEN a Gabriel NÚÑEZ. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2013, **13**(5), 321-335 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1038/nri3430. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri3430>
- [16] MCDERMOTT, Andrew J. a Gary B. HUFFNAGLE. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* [online]. 2014, **142**(1), 24-31 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1111/imm.12231. ISSN 00192805. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12231>
- [17] GUARNER, Francisco a Juan-R MALAGELADA. Gut flora in health and disease. *The Lancet* [online]. 2003, **361**(9356), 512-519 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673603124890>



- [18] DIBAISE, John K, Daniel N FRANK a Ruchi MATHUR. Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. *The American Journal of Gastroenterology Supplements* [online]. 2012, **1**(1), 22-27 [cit. 2018-03-01]. DOI: 10.1038/ajgsup.2012.5. ISSN 1948-9498. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ajgsup20125>
- [19] BRENNAN, Aoife M a Christos S MANTZOROS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology—emerging clinical applications. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* [online]. 2006, **2**(6), 318-327 [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1038/ncpendmet0196. ISSN 1745-8366. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncpendmet0196>
- [20] SMITH, Gideon P. Animal Models of Cutaneous and Hepatic Fibrosis. *Animal Models of Molecular Pathology* [online]. Boston: Elsevier, 2012, s. 371-409 [cit. 2018-03-20]. Progress in Molecular Biology and Translational Science. DOI: 10.1016/B978-0-12-394596-9.00011-1. ISBN 9780123945969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123945969000111>
- [21] VAN DER SPEK, Rianne, Felix KREIER, Eric FLIERS a Andries KALSBECK. Circadian rhythms in white adipose tissue. *The Neurobiology of Circadian Timing* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2012, s. 183-201 [cit. 2018-03-20]. Progress in Brain Research. DOI: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00011-3. ISBN 9780444594273. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444594273000113>
- [22] BLASER, Martin J. *Mizející mikroby: jak nadměrné užívání antibiotik vyvolává epidemie moderní doby*. Vydání první. Přeložil Jana ORLÍKOVÁ. Praha: Slovart, 2015. ISBN 9788073912284.
- [23] MUSSO, G., R. GAMBINO a M. CASSADER. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota: The hygiene hypothesis expanded?. *Diabetes Care* [online]. 2010, **33**(10), 2277-2284 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.2337/dc10-0556. ISSN 0149-5992. Dostupné z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc10-0556>
- [24] PERLMAN, Robert L. Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evolution, Medicine, and Public Health* [online]. 2016, **170-176**, 014- [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1093/emph/eow014. ISSN 2050-6201. Dostupné z: <https://academic.oup.com/emph/article-lookup/doi/10.1093/emph/eow014>
- [25] CHINWALLA, Asif T., Lisa L. COOK, Kimberly D. DELEHAUNTY et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* [online]. 2002, **420**(6915), 520-562 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1038/nature01262. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01262>
- [26] MELINA, Remy. Why Do Medical Researchers Use Mice?. *LiveScience* [online]. New York: LiveScience, 2004 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://www.livescience.com/32860-why-do-medical-researchers-use-mice.html>

- [27] DA SILVA XAVIER, Gabriela a David J. HODSON. Mouse models of peripheral metabolic disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2018, , - [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.beem.2018.03.009. ISSN 1521690X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X18300514>
- [28] LUTZ, Thomas A. a Stephen C. WOODS. Overview of Animal Models of Obesity. ENNA, S.J., ed., Michael WILLIAMS, ed., John F. BARRET, ed., John W. FERKANY, ed., Terry KENAKIN, ed. a Roger D. PORSOLT, ed. *Current Protocols in Pharmacology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2001 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1002/0471141755.ph0561s58. ISBN 0471141755. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471141755.ph0561s58>
- [29] Biologie tukové tkáně: Zvířecí model obezity. In: *FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR* [online]. Praha: Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., 2014 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.fgu.cas.cz/departments/biologie-tukove-tkane>
- [30] Obezita a metabolický syndrom. In: *FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR* [online]. Praha: Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., 2014 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.fgu.cas.cz/articles/88-obezita-a-metabolicky-syndrom>
- [31] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 8021038411.
- [32] AGRICULTURE, G. Douglas Inglis, Matthew C. THOMAS, Dallas K. THOMAS, Martin L. KALMOKOFF, Stephen P.J. BROOKS a L. Brent SELINGER. Molecular Methods to Measure Intestinal Bacteria: A Review. *Journal of AOAC International* [online]. 2012, **95**(1), 5-23 [cit. 2018-01-13]. DOI: 10.5740/jaoacint.SGE\_Inglis. ISSN 1060-3271. Dostupné z: [http://www.ingentaconnect.com/content/10.5740/jaoacint.SGE\\_Inglis](http://www.ingentaconnect.com/content/10.5740/jaoacint.SGE_Inglis)
- [33] ZVÁROVÁ, Jana a Ivan MAZURA. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 978-80-246-2150-0.
- [34] Izolace genomové DNA pomocí fenol-chloroformu. *LAB Guide: Průvodce laboratoři* [online]. Novotný, 2014 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-genomove-dna-pomoci-fenol-chloroformu/>
- [35] KOBETS, Tetyana, Jana BADALOVÁ, Igor GREKOV, Helena HAVELKOVÁ, Milena SVOBODOVÁ a Marie LIPOLDOVÁ. Leishmania parasite detection and quantification using PCR-ELISA. *Nature Protocols* [online]. 2010, **5**(6), 1074-1080 [cit. 2017-01-07]. DOI: 10.1038/nprot.2010.68. ISSN 17542189. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2010.68>
- [36] BARBAS, Carlos F., Dennis R. BURTON, Jamie K. SCOTT a Gregg J. SILVERMAN. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2010,

- 2007(11), 47- [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1101/pdb.ip47. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip47>
- [37] BROWN, T. A. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. 6th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-1-4051-8173-0.
- [38] GALLAGHER, Sean R. a Philippe R. DESJARDINS. Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. HAINES, Jonathan L., ed., Bruce R. KORF, ed., Cynthia C. MORTON, ed., Christine E. SEIDMAN, ed., J.G. SEIDMAN, ed. a Douglas R. SMITH, ed. *Current Protocols in Human Genetics* [online]. 2007. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2001, Supplement 53 [cit. 2018-02-21]. DOI: 10.1002/0471142905.hga03ds53. ISBN 0471142905. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hga03ds53>
- [39] SCHROEDER, Andreas, Odilo MUELLER, Susanne STOCKER et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* [online]. 2006, 7(1) [cit. 2017-01-07]. DOI: 10.1186/1471-2199-7-3. ISSN 14712199. Dostupné z: <http://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2199-7-3>
- [40] ŘÍHOVÁ, Blanka a Marie LIPOLDOVÁ. Molecular methods in immunology. *Folia biologica: journal of cellular and molecular biology*. 1992, (383-4220-37), 220-237. ISSN 00155500.
- [41] PRITCHARD, D. J. a Bruce R. KORF. *Základy lékařské genetiky*. 1. české vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 9788072624492.
- [42] PCR: POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR). *LAB Guide: Průvodce laboratoří* [online]. Novotný, 2014 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/pcr/>
- [43] An Application of GMOs that's not all Pork. *Bio Inspiration* [online]. 2016 [cit. 2017-01-07]. Dostupné z: <http://trollingwithlogic.com/bio-inspiration/an-application-of-gmos-thats-not-all-pork-im-sorry/>
- [44] CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2004, 17(4), 840-862 [cit. 2018-02-12]. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- [45] Quantitative PCR and Digital PCR Detection Methods. *Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Sigma-Aldrich, 2018 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr-and-digital-pcr-detection-methods.html>

- [46] Quantitative PCR: A Technical Guide to PCR Technologies. *Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Sigma-Aldrich, 2018 [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>
- [47] Purifikace nukleových kyselin. *LAB guide: Průvodce laboratoří* [online]. Novotný, 2014 [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/purifikace-nukleovych-kyselin/>
- [48] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 1. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. ISBN 8090290604.
- [49] Elektroforetická separace nukleových kyselin. *LAB Guide: Průvodce laboratoří* [online]. Novotný, 2014 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [50] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62), - [cit. 2017-01-08]. DOI: 10.3791/3923. ISSN 1940087x. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3923/>
- [51] What is gel electrophoresis?. *Your genome* [online]. Cambridge: Public Engagement team at the Wellcome Genome Campus near Cambridge in the UK, 2016 [cit. 2017-01-08]. Dostupné z: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>
- [52] NAMSOLLECK, Pawel, Ralph THIEL, Paul LAWSON et al. Molecular methods for the analysis of gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease* [online]. 2009, **16**(2-3), 71-85 [cit. 2018-02-01]. DOI: 10.1080/08910600410032367. ISSN 1651-2235. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08910600410032367>
- [53] MUYZER, Gerard, Ellen WAAL a A.G. UITTERLINDEN. Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, **59**(3), 695-700.
- [54] KRSEK, Martin. Metody studia diverzity založené na extrakci nukleových kyselin. *Metody studia diverzity půdních mikrobiálních společenstev* [online]. Brno: Fakulta informatiky Masarykovy univerzity, 2014 [cit. 2018-02-13]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob\\_spol/web/pages/03-extrakce-kyselin.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob_spol/web/pages/03-extrakce-kyselin.html)
- [55] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, Jiřina RELICHOVÁ, ed. *Genetika*. Vyd. 1. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2.

- [56] SHENDURE, Jay a Hanlee JI. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* [online]. 2008, **26**(10), 1135-1145 [cit. 2018-02-15]. DOI: 10.1038/nbt1486. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nbt1486>
- [57] Klonování. *LAB Guide: Průvodce laboratoří* [online]. Novotný, 2014 [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/klonovani/>
- [58] ANSORGE, Wilhelm J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology* [online]. 2009, **25**(4), 195-203 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009. ISSN 18716784. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678409000089>
- [59] METZKER, Michael L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2010, **11**(1), 31-46 [cit. 2018-02-25]. DOI: 10.1038/nrg2626. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrg2626>
- [60] PENNISI, E. Semiconductors Inspire New Sequencing Technologies. *Science* [online]. 2010, **327**(5970), 1190-1190 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1126/science.327.5970.1190. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.327.5970.1190>
- [61] RUSK, Nicole. Torrents of sequence. *Nature Methods* [online]. 2011, **8**(1), 44-44 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1038/nmeth.f.330. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nmeth.f.330>
- [62] JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 8024612704.
- [63] SACCA, Rosalba, Bruce ELDER a Katherine WASSON. *The C57BL/6 Mouse: The Role of the C57BL/6N Mouse in the Creation of Future Genetically Engineered Models*. 2013. Dostupné také z: [https://www.criver.com/sites/default/files/Technical%20Resources/The%20Role%20of%20the%20C57BL\\_6N%20Mouse%20in%20the%20Creation%20of%20Future%20Genetically%20Engineered%20Models%20White%20Paper.pdf](https://www.criver.com/sites/default/files/Technical%20Resources/The%20Role%20of%20the%20C57BL_6N%20Mouse%20in%20the%20Creation%20of%20Future%20Genetically%20Engineered%20Models%20White%20Paper.pdf)
- [64] C57BL/6 Mouse. In: *Charles River Laboratories* [online]. Charles River Laboratories, 2018 [cit. 2018-03-31]. Dostupné z: <https://www.criver.com/products-services/find-model/c57bl6-mouse?region=3616>
- [65] ROSSMEISL, Martin, Zuzana MACEK JILKOVA, Ondrej KUDA et al. Metabolic Effects of n-3 PUFA as Phospholipids Are Superior to Triglycerides in Mice Fed a High-Fat Diet: Possible Role of Endocannabinoids. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(6), 38834- [cit. 2018-04-30]. DOI: 10.1371/journal.pone.0038834. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0038834>

- [66] KÖHLER, Anton, Essi SARKKINEN, Niina TAPOLA, Tarja NISKANEN a Inge BRUHEIM. Bioavailability of fatty acids from krill oil, krill meal and fish oil in healthy subjects—a randomized, single-dose, cross-over trial. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2015, **14**(1), - [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1186/s12944-015-0015-4. ISSN 1476-511X. Dostupné z: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-015-0015-4>
- [67] HÖPER, Anje C., Wahida SALMA, Ahmed M. KHALID, Anne D. HAFSTAD, Selene J. SOLLIE, Jan RAA, Terje S. LARSEN a Ellen AASUM. Oil from the marine zooplankton *Calanus finmarchicus* improves the cardiometabolic phenotype of diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition* [online]. 2013, **110**(12), 2186-2193 [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1017/S0007114513001839. ISSN 0007-1145. Dostupné z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0007114513001839](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114513001839)
- [68] LIAO, Hsin-Wei a Mien-Chie HUNG. Intracaecal Orthotopic Colorectal Cancer Xenograft Mouse Model. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2017, **7**(11), - [cit. 2018-04-29]. DOI: 10.21769/BioProtoc.2311. ISSN 2331-8325. Dostupné z: <http://www.bioprotocol.org/e2311>
- [69] QIAGEN, . *QIAamp® PowerFecal® DNA Kit Handbook: For the isolation of DNA from stool, gut material and biosolids*. 2017. Dostupné také z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=00e4513c-597b-4bd5-a600-9259e6d62d07&lang=en>
- [70] FLIEGEROVA, Katerina, Ilma TAPIO, Aurelie BONIN et al. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe* [online]. 2014, **29**, 80-84 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.09.015. ISSN 10759964. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996413001674>
- [71] Stručný slovník NGS pojmů. *SEQme s.r.o.* [online]. Dobříš: SEQme, b.r. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/cs/magazine/glossary>
- [72] Izolace a purifikace DNA/RNA. *Beckman Coulter* [online]. Praha: Beckman Coulter, b.r. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.beckmancoulter.cz/life-sciences/izolace-a-purifikace-dnarna/>
- [73] KUCZYNSKI, Justin, Jesse STOMBAUGH, William Anton WALTERS, Antonio GONZÁLEZ, J. Gregory CAPORASO a Rob KNIGHT. Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. BAXEVANIS, Andreas D., ed., Daniel B. DAVISON, ed., Roderic D.M. PAGE, ed., Gregory A. PETSKO, ed., Lincoln D. STEIN, ed. a Gary D. STORMO, ed. *Current Protocols in Bioinformatics* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2002 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1002/0471250953.bi1007s36. ISBN 0471250953. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471250953.bi1007s36>

- [74] CAPORASO, J Gregory, Justin KUCZYNSKI, Jesse STOMBAUGH et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* [online]. 2010, **7**(5), 335-336 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1038/nmeth.f.303. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nmeth.f.303>
- [75] YU, Zhongtang a Mark MORRISON. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* [online]. 2004, **36**(5), 808-812 [cit. 2018-05-04]. ISSN 1940-9818.
- [76] ORMEROD, Kate L., David L. A. WOOD, Nancy LACHNER et al. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome* [online]. 2016, **4**(1), - [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1186/s40168-016-0181-2. ISSN 2049-2618. Dostupné z: <http://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-016-0181-2>
- [77] CHAKRABORTI, Chandra Kanti. New-found link between microbiota and obesity. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* [online]. 2015, **6**(4), 110- [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.4291/wjgp.v6.i4.110. ISSN 2150-5330. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v6/i4/110.htm>
- [78] KRAJMALNIK-BROWN, Rosa, Zehra-Esra ILHAN, Dae-Wook KANG a John K. DIBAISE. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutrition in Clinical Practice* [online]. 2012, **27**(2), 201-214 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1177/0884533611436116. ISSN 0884-5336. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1177/0884533611436116>
- [79] FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, ODDĚLENÍ BIOLOGIE TUKOVÉ TKÁNĚ, . *Experimental setup, animals, and dietary interventions*. b.r.

## Příloha A: Izolace DNA, koncentrace, ředění DNA

vzorek	COLON			CAECUM			dieta
	DNA naměřená (ng/ul)	DNA 20ng/ul (ul)	H2O (ul)	DNA naměřená (ng/ul)	DNA 20ng/ul (ul)	H2O (ul)	
1	103,3	19,4	80,6	126	15,9	84,1	cHFc
7	143,3	14,0	86,0	165,6	12,1	87,9	cHFc
13	50,5	39,6	60,4	125,3	16,0	84,0	cHFc
17	154,5	12,9	87,1	32,2	62,1	37,9	cHFc
23	39,8	50,3	49,7	130,6	15,3	84,7	cHFc
33	61,2	32,7	67,3	143,7	13,9	86,1	cHFc
39	86,8	23,0	77,0	172,6	11,6	88,4	cHFc
46	102,7	19,5	80,5	203,5	9,8	90,2	cHFc
2	54,3	36,8	63,2	74	27,0	73,0	cHFc-F
8	167,7	11,9	88,1	166,4	12,0	88,0	cHFc-F
14	114,6	17,5	82,5	68,4	29,2	70,8	cHFc-F
18	není			95,7	20,9	79,1	cHFc-F
24	73,7	27,1	72,9	164,3	12,2	87,8	cHFc-F
30	82,3	24,3	75,7	99,5	20,1	79,9	cHFc-F
34	157,5	12,7	87,3	162,9	12,3	87,7	cHFc-F
40	80,7	24,8	75,2	95,8	20,9	79,1	cHFc-F
3	68,3	29,3	70,7	108	18,5	81,5	Krill-H
9	124,1	16,1	83,9	102	19,6	80,4	Krill-H
45	19,1	104,7	-4,7	86,9	23,0	77,0	Krill-H
19	58	34,5	65,5	124,1	16,1	83,9	Krill-H
25	118,8	16,8	83,2	116,7	17,1	82,9	Krill-H
29	63,2	31,6	68,4	110,9	18,0	82,0	Krill-H
35	64,5	31,0	69,0	133,5	15,0	85,0	Krill-H
41	93,6	21,4	78,6	130,1	15,4	84,6	Krill-H
4	108	18,5	81,5	163,2	12,3	87,7	Krill-L
10	109,9	18,2	81,8	148,4	13,5	86,5	Krill-L
15	73,4	27,2	72,8	78,9	25,3	74,7	Krill-L
20	107	18,7	81,3	156,2	12,8	87,2	Krill-L
26	102,9	19,4	80,6	102,5	19,5	80,5	Krill-L
48	126,8	15,8	84,2	181,7	11,0	89,0	Krill-L
36	85,2	23,5	76,5	191,8	10,4	89,6	Krill-L
42	110,7	18,1	81,9	195,5	10,2	89,8	Krill-L
5	83,3	24,0	76,0	107,1	18,7	81,3	CaL-L
11	88,9	22,5	77,5	112,6	17,8	82,2	CaL-L
16	70	28,6	71,4	148,9	13,4	86,6	CaL-L
21	48,6	41,2	58,8	78,6	25,4	74,6	CaL-L
27	72,5	27,6	72,4	72,2	27,7	72,3	CaL-L



<b>32</b>	185,5	10,8	89,2	161,9	12,4	87,6	CaL-L
<b>37</b>	80,4	24,9	75,1	134,5	14,9	85,1	CaL-L
<b>43</b>	97	20,6	79,4	145,8	13,7	86,3	CaL-L
<b>6</b>	174,3	11,5	88,5	177,6	11,3	88,7	STD
<b>12</b>	62,3	32,1	67,9	136,7	14,6	85,4	STD
<b>22</b>	173,1	11,6	88,4	179,2	11,2	88,8	STD
<b>28</b>	66,7	30,0	70,0	126,7	15,8	84,2	STD
<b>31</b>	134,5	14,9	85,1	128,2	15,6	84,4	STD
<b>38</b>	110,1	18,2	81,8	162,8	12,3	87,7	STD
<b>44</b>	141,7	14,1	85,9	208	9,6	90,4	STD
<b>47</b>	80,7	24,8	75,2	104,7	19,1	80,9	STD

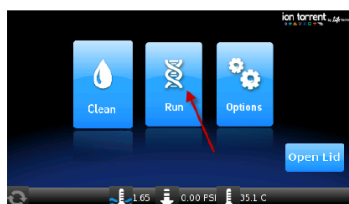
## Příloha B: Namíchání vzorků pro Sangerovo sekvenování

Vzorek (číslo bandu)	primer (μl)	voda (μl)	DNA (μl)
1	2,5	4	3,5
2	2,5	2,5	5
3	2,5	2	5,5
4	2,5	4	3,5
5	2,5	3	4,5
6	2,5	4	3,5
7	2,5	4	3,5
8	2,5	2,5	5
9	2,5	1,5	6
10	2,5	4	3,5
11	2,5	2	5,5
12	2,5	3	4,5
13	2,5	0	7,5
14	2,5	0	7,5
15	2,5	3	4,5
16	2,5	2,5	5
17	2,5	4	3,5
18	2,5	3,5	4
19	2,5	0	7,5
20	2,5	2	5,5
21	2,5	4,5	3
22	2,5	0	7,5

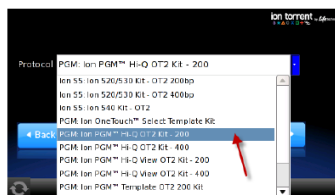
# Příloha C: Protokol pro Ion OneTouch™ 2 Instrument

## Run the Ion OneTouch™ 2 Instrument Day 1 at 4pm

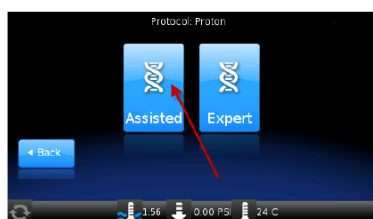
1. Ensure that the centrifuge lid of the Ion OneTouch™ 2 Instrument is closed.
2. On the home screen, touch **Run**:



3. Touch the drop-down menu, then select either **PGM: Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit- 200** or **400** depending on the read-length of the library:



4. Touch **Next**.
5. Touch **Assisted** or **Expert**:

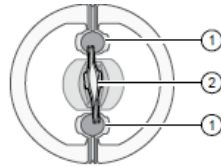


• **Assisted** mode displays the individual task screens for setting up the run. Select this mode if you are a new user and need step-by-step onscreen guidance. Complete each task, and prepare and install the amplification solution then touch **Next**.

## Set up the Ion OneTouch™ 2 Instrument

### A) Install the Ion OneTouch™ Recovery Tubes and Ion OneTouch™ Recovery Router

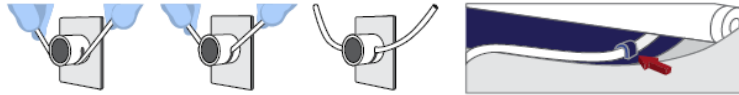
1. Dispense 150  $\mu$ L Ion OneTouch™ **Breaking Solution** into each of two Ion OneTouch™ **Recovery Tubes** and Insert them into the two centrifuge positions.
2. Install the Ion OneTouch™ **Recovery Router** into the center slot of the centrifuge and close the centrifuge lid.



① Ion OneTouch™ Recovery Tube  
② Ion OneTouch™ Recovery Router

**B) Install the Ion OneTouch™ Amplification Plate:**

Remove the used Cleaning Adapter, insert the plate, and pull the **handle** to close the heat block. Thread the disposable **tubing** through **the catch** and **pinch valve**.



**C) Install the disposable injector** (You should hear a click).



**D) Install the Reagent Tubes**

1. Install the Ion OneTouch™ **Oil**: fill the Reagent Tube half-full with Oil.
2. Install the Ion OneTouch™ **Recovery Solution**: fill the Reagent Tube one quarter-full with Recovery Solution.

E) Empty the waste container of waste.

**F) Prepare the amplification solution**

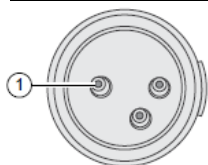
To a 2-mL tube (**violet cap**) containing 800  $\mu\text{L}$  of Ion PGM™ Hi-Q™ **View Reagent Mix**, add the following components in the designated order. Add each component, then pipet the amplification solution up and down to mix:

Order	Reagent	Cap color	volume
1	<b>Nuclease-free Water</b>		25 $\mu\text{L}$
2	Ion PGM™ Hi-Q™ View <b>Enzyme Mix</b>	<b>Brown</b>	50 $\mu\text{L}$
3	Diluted <b>library</b> (26pM)		25 $\mu\text{L}$
4	Ion PGM™ Hi-Q™ View <b>ISPs</b>	<b>Black</b>	100 $\mu\text{L}$

**Prepare the Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs:**

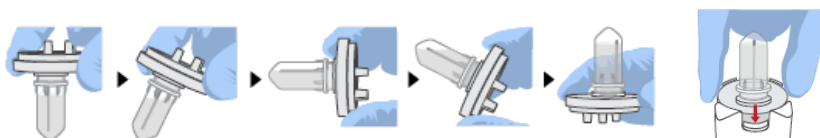
- a. Vortex the ISPs at maximum speed for *1 minute* to resuspend the particles.
- b. Centrifuge the ISPs for 2 seconds.
- c. Pipet the ISPs up and down to mix.**
- d. *Immediately* proceed to the next step.

### G) Fill and install the Ion OneTouch™ Reaction Filter



① Sample port

1. Pipet 1000  $\mu\text{L}$  of the **amplification solution** through the **sample port** of the Ion OneTouch™ Reaction Filter.
2. Pipet 850  $\mu\text{L}$  of Ion OneTouch™ **Reaction Oil** (25-mL size) through the **sample port**.
3. **Change the tip** and pipet an additional 850  $\mu\text{L}$  of Ion OneTouch™ **Reaction Oil** through the **sample port**.
4. Invert then install the filled Ion OneTouch™ **Reaction Filter** into the three holes on the top stage of the Ion OneTouch™ 2 Instrument



### H) Start the run

1. After installing the Ion OneTouch™ Reaction Filter, touch **Next** to **start the run**. Remove the samples <16 hours after starting the **run**.

### **Day 2 in the morning**

#### A) Recover the template-positive ISPs

1. At the end of the run, follow the screen prompts to centrifuge the sample
2. After the centrifuge has stopped, touch **Open Lid**. Wait until the lid clicks open, **then remove and discard** the Ion OneTouch™ **Recovery Router**.
3. Remove both Ion OneTouch™ **Recovery Tubes** from the instrument, then put the two tubes in a tube rack.
4. Remove all but **100  $\mu\text{L}$**  of the Recovery Solution from each Recovery Tube.
5. Process the ISPs:
  - a. Add 500  $\mu\text{L}$  of Ion OneTouch™ **Wash Solution** to each Recovery Tube.
  - b. Pipet **up and down** to disperse the ISPs, then **combine the suspension** from each Recovery Tube **into one** new labeled 1.5-mL **Eppendorf LoBind™ Tube**.
  - c. Centrifuge the ISPs for **2.5 minutes at 15,500  $\times g$** .
  - d. remove all but **100  $\mu\text{L}$**  of the Wash Solution from the tube.( Withdraw the supernatant from the surface and on the opposite side from the pellet).

#### B) Enrich the template-positive Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs

##### **B1) Prepare reagents then fill the 8-well strip**

##### **I) ISPs**

1. Obtain an 8-well strip from the Ion OneTouch™ ES Supplies Kit. Ensure that the square-shaped tab of an 8-well strip is on the left:



2. Pipet the ISPs up and down 10 times to mix, then transfer the suspension into Well 1 of the 8-well strip.

**II) Wash and resuspend the Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1Beads:**

1. Vortex the tube of Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin **C1 Beads** for 30 seconds to resuspend the beads thoroughly, then centrifuge the tube for 2 seconds.

2. pipet the dark pellet of beads up and down until the pellet disperses.

3. Transfer **13 µL** of Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin **C1 Beads** to a new 1.5-mL **Eppendorf LoBind™ Tube**.

4. **Place the tube on a magnet for 2 minutes**, then carefully **remove and discard the supernatant** without disturbing the pellet.

5. Add **130 µL** of My One™ Beads **Wash Solution** to the Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads.

6. Remove the tube from the magnet, **vortex** the tube.

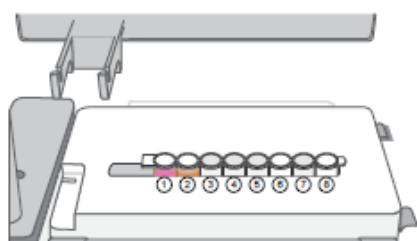
**III) Prepare Melt-Off Solution**

Prepare fresh Melt-Off Solution by combining the components in the following order:

Order	Component	Volume
1	Tween™ Solution	<b>280 µL</b>
2	1M NaOH	<b>40 µL</b>
	<b>Total</b>	<b>320 µL</b>

**IV) Fill the remaining wells in the 8-well strip as follows:**

Well number	Reagent to dispense in well
Well 1 I) ISPs	100 µL Template positive ISPs
Well 2 II) Wash and resuspend the Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1Beads	130 µL Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads+ My One™ Beads Wash Solution
Well 3	300 µL of Ion OneTouch™ Wash Solution
Well 4	300 µL of Ion OneTouch™ Wash Solution
Well 5	300 µL of Ion OneTouch™ Wash Solution
Well 6	////
Well 7 III) Prepare Melt-Off Solution	300 µL of freshly-prepared Melt-Off Solution
Well 8	////



\*\*Confirm that the square-shaped tab is on the left, then insert the filled 8-well strip with the 8-well strip pushed all the way to the right end of the slot of the Tray

## B2) Prepare the Ion OneTouch™ ES

1. Install a **new PCR collection tube** and a **new pipette tip**.
2. Add **10 µL of Neutralization Solution** to a new 0.2-mL PCR tube.



## B3) Perform the run

1. Press **Start/Stop**. The screen displays "run" during the run. The run takes ~35 minutes.
2. At the end of the run, the instrument displays "End" and beeps. Press the **Start/Stop** button
3. Immediately after the run, securely close, then remove the PCR tube containing the enriched ISPs.
4. Mix the contents of the PCR tube by gently inverting the tube 5 times.  
Note: Ensure that the 0.2-mL PCR tube has >200 µL of solution containing the enriched ISPs. After a successful run on the instrument, the sample is in ~230 µL of Melt-Off Solution, Ion OneTouch™ Wash Solution, and Neutralization Solution. If the tube has <<200 µL of solution containing the enriched ISPs, contact Technical Support.
7. Remove then discard the used tip and used 8-well strip.

## C) Clean the Ion OneTouch™ 2 Instrument

1. Determine the appropriate reagents to use for maintaining the Ion OneTouch™ 2 Instrument: Already using the **Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit**.
2. Check the level of Ion **OneTouch™ Oil** in the Reagent Tube (must be half-full).
3. Remove and discard the used Ion OneTouch™ Reaction **Filter**.
4. Insert the Cleaning **Adapter** into the three holes on the top stage of the Instrument.
5. Keep the Ion OneTouch™ Amplification Plate in the heat block.
6. The tubing is out of the valve. Remove **the injector** from the Ion OneTouch™ DL Injector Hub and place it into the **waste tube**.
7. On the home screen of the instrument, touch **Clean**.
8. Complete each task that is displayed on the screen, then touch **Next**. After you touch Next on the last task, a progress bar appears, and the cleaning starts.
9. At the end of the cleaning run, the screen displays "**Time Remaining 00:00:00, Cleaning Run Complete**". Press **Next**
10. Remove and discard the used **Amplification Plate, injector, and tubing**.  
(Leave the heat block open)
11. On the instrument display, touch **Open Lid**, wait until the lid clicks open, then open the centrifuge lid. Wipe the residue from the centrifuge lid with dry Kimwipes™ disposable wipers, then **close the centrifuge lid**.
12. Touch **Next** to return to the home screen on the instrument.

# Příloha D: Protokol pro Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit

## Create a Planned Run

### Condition the Wash 2 Bottle for first use

To condition the Wash 2 Bottle:

1. Fill the bottle to the mold line with 18 M $\Omega$  water, add the entire container of Wash 2 Bottle Conditioning Solution, then cap the bottle and invert it 5 times to mix.

2. Allow the bottle to sit at room temperature for at least 8 hours (preferably overnight)

### Clean the Ion PGM™ System

18 M $\Omega$  water cleaning

1. Press **Clean**, and select the **18-MO $\Omega$  water cleaning**. Press **Next**.
2. Using ungloved hands, secure a **used chip** designated for cleaning **in the chip clamp**.
3. **Remove all wash and reagent bottles** attached to the instrument. **Keep the sippers** in place at all positions. Press **Next**.
4. **Empty** any remaining solution from each cleaning bottle and **rinse** each **bottle** twice with ~100 mL of 18 M $\Omega$  water.
5. **Add 250 mL of 18 M $\Omega$  water** to an empty **250-mL cleaning bottle W1**.
6. **Rinse the outside of the sipper tube in the W1 position** on the instrument with 18 M $\Omega$  water.
7. **Attach the 250-mL bottle containing 18 M $\Omega$  water to the W1 position**, ensuring that the **W1 cap is screwed on tightly**. Press **Next**.
8. Place the **empty 2-L cleaning bottle in the W2 position** and the **empty 250-mL bottle in the W3 position**. Do not screw on the caps.
9. Place **collection trays** below the **reagent sippers in the dNTP positions**. Press **Next** to begin cleaning.
10. When cleaning is complete, **remove the bottles and sippers from the W1, W2 and W3 positions**. **Leave the reagent sippers and collection trays in place**. Press **Next** to return to the main menu and proceed to initialization.

### Initialize the Ion PGM™ System

Before initialization Check the tank pressure for the nitrogen gas.

#### Prepare the Wash 2 Bottle

1. Rinse the Wash 2 Bottle (2 L) 3 times with 200 mL of 18 M $\Omega$  water.
2. Fill the bottle to the **mold line** with **18 M $\Omega$  water**. The volume of water is ~2 liters.
3. Add the **entire bottle of Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W2 Solution** to the **Wash 2 Bottle**.
4. Add **70  $\mu$ L of 100 mM NaOH** to the **Wash 2 Bottle**.
5. Cap the bottle and **invert 5 times to mix**

#### Prepare the Wash 1 and Wash 3 Bottles

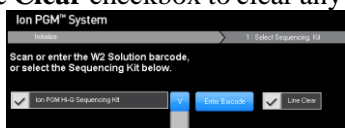
1. **Rinse** the Wash 1 and Wash 3 Bottles 3 times with 50 mL of 18 M $\Omega$  water.
2. **Wash 1 Bottle:** Add **350  $\mu$ L** of freshly prepared **100 mM NaOH** to the **Wash 1 Bottle**, then cap the bottle.
3. **Wash 3 Bottle:** Add Ion **PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W3 Solution** to the **50-mL line** marked on the **Wash 3 Bottle**, then cap the bottle.

#### Begin the initialization

1. On the main menu, press **Initialize**.



2. Make the following selections in the next screen, then press **Next**:
  - Click **Enter barcode** to scan or enter the barcode on the Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W2 Solution bottle, or the 2D barcode on the Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Solutions box.
  - Alternatively, select the checkbox for the **Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit** from the dropdown list.
  - In the same screen, if you routinely experience clogging during initialization, select the **Line Clear** checkbox to clear any blockage in the fluid lines before initialization. This is optional.



After you press **Next**, the system will check the gas pressure.

3. Following the gas pressure check:
  4. Wearing clean gloves, **firmly attach a new, long gray sipper to the cap in the W2 position.**
  5. **attach the prepared Wash 2 Bottle** in the W2 position, **then tighten the cap.** Press **Next.**
  6. **firmly install new sipper tubes (short gray) in the caps in the W1 and W3 positions.**
  7. **attach the prepared Wash 1 and 3 Bottles, then tighten the caps.** Press **Next.**
  8. Following line clear, or if you did not select that option, the sequencer **begins adjusting the pH of the W2 Solution, which takes ~30 minutes.** After **15 minutes, check the instrument touchscreen** to confirm that initialization is proceeding normally.

#### **Prepare the 50-mL Reagent Bottles with dNTPs**

1. label four new Reagent Bottles as dGTP, dCTP, dATP, and dTTP.
2. Put **20 µL** of each dNTP stock solution into its respective Reagent Bottle.
3. Cap each Reagent Bottle and store on ice until you are ready to attach it to the instrument. dNTP stocks back into  $-20^{\circ}\text{C}$  for storage.

#### **Attach the sipper tubes and Reagent Bottles**

1. After the wash solutions have initialized, **remove the sipper tubes** and collection trays from the dNTP ports.
2. **insert a new sipper tube (blue) into each dNTP port.**
3. **Attach each prepared Reagent Bottle to the correct dNTP port and tighten firmly** by hand until snug. Press **Next.**
4. Follow the touchscreen prompts to complete initialization. The instrument will fill each Reagent Bottle with 40 mL of W2 Solution.
5. At the end of initialization, Ion PGM™ System will measure the pH of the reagents:
  - If every reagent is in the target pH range, a green **Passed** screen will be displayed.
6. Press **Next** to finish the initialization process and return to the main menu.

#### **Load the chip and start the sequencing run**

##### **Add controls to the enriched, template-positive ISPs**

1. **Vortex the Control Ion Sphere™ Particles**, then pulsecentrifuge in a picofuge for 2 seconds before taking aliquots.
2. Add **5 µL** of Control ISPs directly to the entire volume of enriched, **template-positive ISPs** in a 0.2-mL PCR tube.

##### **Anneal the Sequencing Primer**

1. **Mix** the tube containing the ISPs by thoroughly **pipetting up and down.**
2. **Centrifuge for 2 minutes at 15,500 × g.**
3. **remove the supernatant. Leave ~15 µL** in the tube
4. Vortex the primer for 5 seconds, **Add 12 µL of Sequencing Primer to the ISPs**, then confirm that the total volume is 27 µL

- Pipet the **mixture up and down** thoroughly to **disrupt the pellet**.
- Place the tube in the **thermal cycler**, Program a thermal cycler for **95°C for 2 minutes and then 37°C for 2 minutes**, then run the program.

### Perform Chip Check

- On the main menu of the Ion PGM™ Sequencer touchscreen, press **Run**. **Remove the waste bottle and completely empty it**. Press **Next**.
- use the same **used chip that was used for initialization**. Press **Next** to clean the fluid lines.
- select the instrument** that you used to prepare the template-positive ISPs (**OT2**). Then press **Next**.
- use the scanner to scan the **barcode** located on the new chip, or press **Change** to enter the barcode manually.
- Replace the old chip with the new one. Close the chip clamp, then press **Next**.
- Press **Chip Check**
- Following a successful Chip Check, empty the waste bottle, then select the **Waste bottle is empty** checkbox on the touchscreen. Press **Next**.

### Bind the Sequencing Polymerase to the ISPs

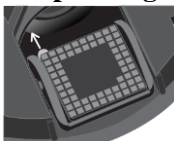
- After annealing the Sequencing Primer, **add 3 µL of Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerase** to the ISPs, for a **total final volume of 30 µL**.
- Pipet the sample up and down to mix**, then incubate at room temperature for **5 minutes**.

### Remove liquid from the chip

- Following chip calibration, **remove the new chip from the Ion PGM™ Sequencer**. Insert a used chip in the chip clamp while loading the new chip.
- Tilt the new chip at a 45° angle so that the loading port is the lower port.
- Insert the pipette tip firmly into the loading port, then **remove as much liquid as possible from the loading port**. Discard the liquid.



- Place the chip **upside-down** in the **minifuge bucket**, then transfer the bucket **with the chip tab pointing in** (toward the center of the minifuge). Balance the bucket with another chip.



- Centrifuge for 5 seconds** to empty the chip completely.
- Remove the chip from the bucket, then **wipe the bucket** with a disposable **wipe to remove any liquid**.

### Load the chip

- Place the chip rightside up in the bucket on flat surface. Following polymerase incubation, load the chip with following volume of prepared ISPs

Chip	Volume to load	Recommended pipette <sup>[1]</sup>
Ion 316™ or Ion 318™ Chip	Entire volume (~30 µL)	Rainin™ Pipet-Lite™ LTS L-100XLS, 10-100 µL
Ion 314™ Chip	10 µL	Rainin™ Pipet-Lite™ LTS L-20XLS, 2-20 µL

- Insert the tip** firmly into the **loading port of the chip**.
- With the pipette unlocked, apply gentle pressure between the tip and chip and slowly dial down the pipette (~1 µL per second) to deposit the ISPs. To avoid introducing bubbles into the chip, leave a small amount in the pipette tip (~0.5 µL).



4. Remove, then discard any displaced liquid from the other port of the chip.
5. Transfer the chip in the bucket to the minifuge with the chip tab **pointing in** (toward the center of the minifuge), then **centrifuge for 30 seconds**.



6. Turn the chip so that the chip tab is **pointing out** (away from the center of the minifuge), then **centrifuge for 30 seconds**.



7. Remove the bucket from the minifuge, then place it on a flat surface. Set the volume of the pipettor as follows, depending on your chip type:

- **Ion 316™ or Ion 318™ Chip:** 25  $\mu$ L

8. Tilt the chip at a 45° angle so that the loading port is the lower port, then insert the pipette tip into the loading port.

9. Without removing the tip, slowly pipet the sample out and then back into the chip one time. **Pipet slowly to avoid creating bubbles.**

10. Slowly remove as much liquid as possible from the chip by dialing the pipette. Discard the liquid.

11. Turn the chip **upside-down** in the bucket, transfer it back to the minifuge, then centrifuge **for 5 seconds**. Remove and **discard any liquid**.

12. If some liquid remains in the chip, lightly and rapidly tap the point of the chip tab against the benchtop a few times, then remove and discard any collected liquid. Do not flush the chip.

13. When chip loading is complete, press **Next** on the touchscreen, then proceed immediately to performing the run.

### **Select the Planned Run and perform the run**

#### **Select the Planned Run**

1. Press **Browse** next to the **Planned Run** field and select the name of the plan you created, then touch **Next**.

2. Confirm that the settings are correct. If necessary, make any changes using the touchscreen controls.

#### **Perform the run**

1. After you enter the Planned Run, press **Next** to verify the experimental setup. Press **OK** to confirm the settings or press **Cancel** to return to the touchscreen to adjust the settings.

2. When prompted by the instrument, load and clamp the chip, then press **Next**.

3. At the beginning of the run, visually inspect the chip in the clamp for leaks before closing the cover. The instrument will flush any loose ISPs from the chip and begin calibrating the chip.

4. When the calibration is complete (~1 minute), the touchscreen will indicate whether calibration was successful.

5. After 60 seconds, the run will automatically begin, or press **Next** to begin the run immediately.

6. When the run is complete, leave the chip in place, then touch **Next** to return to the Main Menu. You can then remove the chip and proceed with another run or perform a cleaning/initializing if required.

## Příloha E: Maps – QIIME

#SampleID	BarcodeSequence	LinkerPrimerSequence	Study	Sample	Mouse	Tract	Description
1	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	6	23	caecum	STD	
2	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	12	37	caecum	STD	
3	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	22	26	caecum	STD	
4	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	28	32	caecum	STD	
5	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	31	54	caecum	STD	
6	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	38	47	caecum	STD	
7	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	44	52	caecum	STD	
8	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	47	49	caecum	STD	
9	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	1	16	caecum	chFc	
10	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	7	7	caecum	chFc	
11	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	13	31	caecum	chFc	
12	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	17	51	caecum	chFc	
13	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	23	21	caecum	chFc	
14	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	33	15	caecum	chFc	
15	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	39	29	caecum	chFc	
16	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	46	30	caecum	chFc	
17	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	2	42	caecum	chFc-F	
18	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	8	8	caecum	chFc-F	
19	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	14	34	caecum	chFc-F	
20	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	18	6	caecum	chFc-F	
21	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	24	18	caecum	chFc-F	
22	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	30	45	caecum	chFc-F	
23	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	34	27	caecum	chFc-F	
24	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	40	38	caecum	chFc-F	
25	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	3	50	caecum	Krill-H	
26	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	9	33	caecum	Krill-H	
27	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	45	10	caecum	Krill-H	
28	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	19	13	caecum	Krill-H	
29	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	25	17	caecum	Krill-H	
30	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	29	20	caecum	Krill-H	
31	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	35	19	caecum	Krill-H	
32	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	41	9	caecum	Krill-H	
33	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	4	24	caecum	Krill-L	
34	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	10	36	caecum	Krill-L	
35	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	15	12	caecum	Krill-L	
36	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	20	41	caecum	Krill-L	
37	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	26	11	caecum	Krill-L	
38	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	48	25	caecum	Krill-L	
39	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	36	48	caecum	Krill-L	
40	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	42	53	caecum	Krill-L	
41	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	5	22	caecum	CaL-L	
42	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	11	14	caecum	CaL-L	
43	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	16	46	caecum	CaL-L	
44	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	21	40	caecum	CaL-L	
45	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	27	2	caecum	CaL-L	

46	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	32	3	caecum	CaL-L
47	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	37	28	caecum	CaL-L
48	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	43	1	caecum	CaL-L
49	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	6	23	colon	STD
50	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	12	37	colon	STD
51	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	22	26	colon	STD
52	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	28	32	colon	STD
53	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	31	54	colon	STD
54	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	38	47	colon	STD
55	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	44	52	colon	STD
56	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	47	49	colon	STD
57	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	1	16	colon	chFc
58	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	7	7	colon	chFc
59	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	13	31	colon	chFc
60	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	17	51	colon	chFc
61	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	23	21	colon	chFc
62	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	33	15	colon	chFc
63	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	39	29	colon	chFc
64	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	46	30	colon	chFc
65	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	2	42	colon	chFc-F
66	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	8	8	colon	chFc-F
67	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	14	34	colon	chFc-F
69	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	24	18	colon	chFc-F
70	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	30	45	colon	chFc-F
71	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	34	27	colon	chFc-F
72	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	40	38	colon	chFc-F
73	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	3	50	colon	Krill-H
74	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	9	33	colon	Krill-H
75	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	45	10	colon	Krill-H
76	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	19	13	colon	Krill-H
77	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	25	17	colon	Krill-H
78	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	29	20	colon	Krill-H
79	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	35	19	colon	Krill-H
80	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	41	9	colon	Krill-H
81	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	4	24	colon	Krill-L
82	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	10	36	colon	Krill-L
83	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	15	12	colon	Krill-L
84	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	20	41	colon	Krill-L
85	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	26	11	colon	Krill-L
86	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	48	25	colon	Krill-L
87	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	36	48	colon	Krill-L
88	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	42	53	colon	Krill-L
89	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	5	22	colon	CaL-L
90	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	11	14	colon	CaL-L
91	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	16	46	colon	CaL-L
92	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	21	40	colon	CaL-L
93	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	27	2	colon	CaL-L
94	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	32	3	colon	CaL-L
95	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	37	28	colon	CaL-L
96	GGATTAGATACCCTGGTAGT	obesity	43	1	colon	CaL-L

## **Příloha F: Analýza NGS dat ve formátu \*.fastq - QIIME**

Pro jeden vzorek:

```
convert_fastaqual_fastq.py -f '/home/qiime/pgm/01.fastq' -o '/home/qiime/pgm/01' -c  
fastq_to_fastaqual
```

```
validate_mapping_file.py -m '/home/qiime/pgm/01/maps01.txt' -b -p -o  
'/home/qiime/pgm/01/01_mapping_check'
```

```
split_libraries.py -m '/home/qiime/pgm/01/maps01.txt' -f '/home/qiime/pgm/01/01.fna' -  
q '/home/qiime/pgm/01/01.qual' -o '/home/qiime/pgm/01/01_split' -b 0 -l 250 -w 50 -s  
15
```

```
cat '/home/qiime/pgm/01/01_split/seqs.fna'> '/home/qiime/pgm/combined_seqs.fna'
```

```
validate_demultiplexed_fasta.py -m '/home/qiime/pgm/maps.txt' -i  
'/home/qiime/pgm/combined_seqs.fna' -o '/home/qiime/pgm/validate_demultiplexing' --  
suppress_barcode_checks
```

```
identify_chimeric_seqs.py -m usearch61 -i '/home/qiime/pgm/combined_seqs.fna' -r  
'/home/qiime/pgm/chimera/97_otus.fasta' -o '/home/qiime/pgm/chimera/' --threads 4
```

```
pick_open_reference_otus.py -i '/home/qiime/pgm/combined_seqs.fna' -o  
'/home/qiime/pgm/open_ref_OTU_pick' -p '/home/qiime/pgm/param.txt'
```

```
biom summarize-table -i  
'/home/qiime/pgm/open_ref_OTU_pick/otu_table_mc2_w_tax.biom' -o  
'/home/qiime/pgm/open_ref_OTU_pick/otu_table_summary.txt'
```

```
core_diversity_analyses.py -o '/home/qiime/pgm/core_diversity' -i  
'/home/qiime/pgm/open_ref_OTU_pick/otu_table_mc2_w_tax.biom' -m  
'/home/qiime/pgm/maps.txt' -t '/home/qiime/pgm/open_ref_OTU_pick/rep_set.tre' -e  
1212 -p '/home/qiime/pgm/param.txt' -c Description
```

```
alpha_diversity.py -i  
'/home/qiime/pgm/open_ref_OTU_pick/otu_table_mc2_w_tax.biom' -m  
chao1,observed_otus,equitability,gini_index,observed_species,shannon,simpson -o  
'/home/qiime/pgm/caecum_alpha.txt'
```

## **Příloha G: Obsah přiloženého CD**

Klíčová slova

Abstrakt česky

Abstrakt anglicky

Naskenované zadání diplomové práce

Kompletní diplomová práce