MIKROBIOMNOVINY

Informační servis

České mikrobiomové společnosti ČLS JEP, z.s.

Motto měsíce:

Silou smečky je vlk
A síla vlka je ve smečce.
Rudyard Kipling z Knihy džunglí

Upozornění na akce:

Městská knihovna, Praha:

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

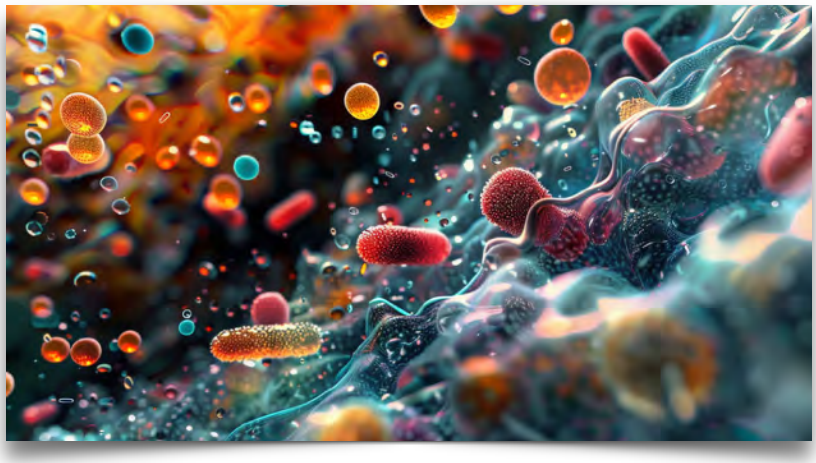
Místo konání: malý sál
Ústřední městské knihovny
Mariánské náměstí, Praha 1
Čas konání: 19:00

19.6. 2024
Mgr. Michal Kraus, MBÚ,
Mikroochranismy: Jak mikrobiom pomáhá naší imunitě? ZDE

Konference:

17. - 18. 6. 2024
NNI Workshop, **on-line** ZDE

11. - 13.9.
PCPC2024 - 3rd Polish-Czech Probiotic Conference
Karczowiska, Poland, registrace ZDARMA, termín registrace prodloužen do 24.6. **ZDE**



Editorial

Milé čtenářky, milí čtenáři,

bez mikrobů zdraví člověk nezíská, ač v klidu je anebo stále pospíchá…

Inovace, analýza, diverzita, v níž je síla, fermentace, regulace, dynamická interakce, imunitní modulace, mikrobiom = mocný strážce…

Nebo co začít takto? Mikrobi ve vzduchu, mikrobi v dešti, mikrobi v mořích, mikrobi v půdě, mikrobi v nás, mikrobi na nás, mikrobi kolem nás, mikrobi s námi a my s mikroby, zkrátka mikrobi všude. Vděčíme jim za mnohé, třeba za 20 % kyslíku, který dýcháme…

Prostě a jednoduše a do třetice všeho mikrobiálního. Chtěl jsem napsat, že my a mikrobiota jsme na této planetě nerozlučným tandemem. Poskytujeme mikrobům potřebné substráty a zázemí a samozřejmě jim věnujeme adekvátní pozornost a péči, a to ve vlastním zájmu. No a mikrobi nás chrání před patogeny, pořádají v rámci organismu ve spolupráci s imunitním systémem rozličná školení a edukační workshopy = takové klasické celoživotní vzdělávání :0), napomáhají trávení a vstřebávání živin, tvoří některé vitamíny, podílí se na metabolismu léčiv, vyrábí palivo pro střevní buňky, podporují střevní bariéru, snižují zánětlivou odpověď organismu, brání rozvoji některých onemocnění včetně těch nádorových. A co třeba regulace chuti k jídlu? Vliv na chování a mozkové funkce? Vliv na funkci svalů? Tento seznam je rozsáhlý, je důvodem ke každodenní oslavě a respektu k mikrobiotě. Navíc se nejedná o konečný výčet mikrobiálních funkcí a tento „mikrobiální seznam" bude s rozvojem našeho poznání narůstat.

18. - 20.6.
International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health – IPC2024, **Praha** ZDE

22. - 24.6.
IHMC 10th International Human Microbiome Consortium Congress 2024, **Řím** ZDE

26.-29. 6.
EUROBIOFILMS 2024**,** **Kodaň** ZDE

19. - 21.9.
Kongres klinické mikrobiologie, infektologie a epidemiologie 2024 **Ostrava** ZDE

19. - 21.9.
World of microbiome, **Sofie** ZDE

Vlastnosti mikrobioty jsou skutečně podivuhodné, mikrobi spolu efektivně komunikují a vytvářejí např. i biofilmy. Mohou být tyto biofilmy prospěšné nebo jsou všechny bio**filmy** hororové a skýtají nebezpečí, s nímž obtížně bojujeme? Dozvíte se v tomto čísle Mikrobio(m)novin. Nahlédnete do tradičního metodického okénka, čekají vás aktuality a pozvánky na akce, které se mikrobiotě věnují.

Mikrobiota s námi sdílí naše životy a ráda společně oslaví Světový den mikrobiomu. 27. června se již blíží. Tak ať se oslava vydaří. Děkujeme vám, že otevíráte další číslo Mikrobio(m)novin.

Příjemné čtení.

Jiří Vejmelka

Téma měsíce:

Nebojme se biofilmu .... můžeme ho sakra potřebovat!

V předešlém čísle Mikrobio(m)novin jsme obsadili biofilm do role hlavního padoucha, i když poslední slova hlavního článku naznačovala, že situace není černobílá. Určité nepříjemné vlastnosti bakterií rostoucích v biofilmu, se kterými se potkáváme v oblasti medicíny, jsou více než vyváženy tím, co pro nás bakterie v podobě biofilmu mohou udělat v jiných oblastech. Pojďme se tedy podívat na úžasné vlastnosti biofilmů ještě jednou, tentokrát s biofilmem v roli skřítků pomocníčků.

Reaktory pro biofilm

Připomeňme si základní vlastnosti biofilmů: adheze k povrchu (většinou), velká hustota mikroorganismů, tvorba extracelulární matrix a heterogenní metabolismus. Biofilm je komplexní „organism-like" struktura, která se sama vyvíjí a přizpůsobuje měnícím podmínkám prostředí, tak aby optimalizovala funkci, což je z hlediska cíleného využití výhodné. Heterogenní metabolismus znamená, že v různorodé populaci tvořící biofilm probíhá řada různých metabolických procesů najednou, přičemž výsledky jednoho děje realizovaného určitým typem bakterií často umožňují existenci jiného druhu. Biofilmy rostoucí na pevném povrchu mají charakter retentostatu (bioreaktoru, v němž rostoucí buňky dosáhnou ustáleného stavu, kdy je kultivační kapalina z bioreaktoru odváděna a nahrazována čerstvým živným médiem, ale filtr zadržuje biomasu) se stacionárním biokatalyzátorem pracujícím v kontinuálním režimu. Takto je možný dlouhodobý provoz s jednoduchou separací produktu a biokatalyzátoru.

Efektivní využití biofilmu v biotechnologiích klade určité požadavky na bioreaktory – nejdůležitější parametr je poměr povrch/objem. V současnosti se používají tři základní typy reaktorů a nepřeberně jejich modifikací. Nejobvyklejší bioreaktory jsou **jednoduché tanky, v nichž je médium kontinuálně promícháváno**, které se obvykle používají pro planktonicky rostoucí kultury. Pokud však tyto reaktory obsahují i pevné částice jako povrch pro adhezi, je možné je využít i pro kultivaci biofilmu. Druhým typem jsou **rotační reaktory**, buď v podobě jednoho rotujícího válce, nebo soustavy rotujících disků. Při tomto uspořádání se biofilm opakovaně dostává do kontaktu s tekutou a plynnou fází. Posledním typem jsou **membránové reaktory,** kde membrána slouží dvojímu účelu. Jednak jako povrch, na kterém biofilm roste, a kromě toho k výměně plynů mezi vnitřním a vnějším prostředím. Membránové bioreaktory existují v mnoha podobách, např. jako trubice, kapiláry nebo dutá vlákna. Pokud jsou tvořeny průsvitnými materiály, je možné je využít i k pěstování fototrofních organismů. Kromě člověkem zkonstruovaných bioreaktorů však využíváme i bioreaktory **přírodní**. Biofilm najdeme např. na kořenech rostlin, v odpadních kalech a na mnoha dalších místech, kde, často nevědomky, využíváme jeho služby.

Výroba organických látek („bílé" biotechnologie)

Využití mikroorganismů k produkci různých organických látek sahá hluboko do minulosti, jak už jsme psali v Mikrobio(m)novinách v říjnu 2023 věnovaným fermentaci. Nicméně jedním z výrazných limitujících faktorů je toxicita vznikajícího produktu (např. kyselina octová nebo alkohol), která v planktonické kultuře nakonec produkující mikroorganismy zahubí a vede k ukončení procesu fermentace. Využití biofilmu v kombinaci s vhodným bioreaktorem umožňuje produkty přeměny efektivně odvádět a udržet výkonnost systému nesrovnatelně déle. Pár příkladů: *Lactobacillus delbrueckii* se využívá k výrobě kyseliny mléčné, ovšem produkce v tubulárním biofilmovém reaktoru je 6-8x vyšší než v tanku s volně rostoucími bakteriemi. *Pseudomonas taiwanensis* dokáže konvertovat cyklohexan a styren na cyklohexanol nebo S-styren oxid, které mají široké použití v mnoha odvětvích chemického, farmaceutického, a kosmetického průmyslu. Vznikající produkty jsou však pro bakterie vysoce toxické. Při využití membránového tubulárního bioreaktoru (průměr 2 mm, délka 200 mm) je možné toxický produkt průběžně odvádět a udržet tak systém v produkčním stavu týdny až měsíce.

Elektroaktivní biofilmy

Mnoho mikroorganismů ze všech tří domén (Archea, Bacteria, Eukarya) dokáže produkovat elektrický proud a přenášet elektrony na anody různých typů bioelektrochemických systémů. Jsou to zejména bakterie redukující železo, jako je *Geobacter sulfurreducens*, které jsou efektivní při mírných teplotách - u biofilmů tvořených různými bakteriemi rodu *Geobacter* byla změřena intenzita proudu na anodě 5.7 – 9.3 A m^{-2}. Se správným médiem a růstovými podmínkami mohou vysoké proudové hustoty vytvářet i mnohé další mikroorganismy, od běžných kvasinek až po extremofily, jako jsou hypertermofilní archaea. Mikrobiální elektrochemické technologie se uplatňují při vývoji mikrobiálních desalinizačních jednotek [1], syntetických článků konvertujících např. CO_2 na metan, acetát nebo etanol [2], mikrobiálních palivových článků generujících elektrický proud [3] nebo mikrobiálních biosenzorů [4]. Zcela praktickým využitím mikrobiálních palivových článků je spojení čištění odpadních

vod a produkce energie. Organické sloučeniny v odpadních vodách obsahují obrovské množství chemicky vázané energie, kterou bakterie, např. *G. sulphurreducens*, mohou uvolnit v podobě toku elektronů. Odpadní vody se tak mohou čistit přímo, bez dodávání energie jinak potřebné na provzdušňování kalů. Pokud není zapotřebí vyrábět na místě elektrickou energii, je možné článek upravit tak, aby v katodové komoře docházelo k elektrolýze vody a byl produkován vodík.

Biofotovoltaické články

„Vyšší dívčí" v oboru bioelektrochemických systémů jsou biofilmy založené na autotrofních organismech. Princip těchto článků je stejný jako u výše popsaných elektroaktivních biofilmů, ovšem zdrojem energie je světlo. Zatím nejlepších výsledků bylo dosaženo s cyanobakterií *Synechococcus* sp. WH 5701 rostoucí jako biofilm přímo na transparentní vodivé anodě. Maximální výkon článku byl 10,3 mWm^{-2} při osvětlení o intenzitě 10 Wm^{-2} a výkon byl udržitelný několik týdnů. Čtyři v sérii zapojené články vyrobily dostatek proudu na napájení komerčního digitálního budíku [5].

Výroba biopaliv

Žluté lány řepky viditelné možná i z vesmíru se rychle postaraly o negativní vnímání biopaliv jako takových. Nicméně, pokud tato komodita nemá sloužit primárně jako nástroj k čerpání dotací, ale skutečně jako alternativní zdroj pohonných hmot, mohou být fototrofní biofilmy cennými pomocníky. Koneckonců, i zatím naprosto převažující ropa má svůj původ v CO_2 kdysi zachyceném a uloženém fotosyntetizujícími organismy. Kapilární reaktory pro biofilm se zdají být ideálním řešením, ale problémem je odpadní produkt fotosyntézy – O_2 – který je toxický a brzdí růst biofilmu. Nicméně, i tento problém lze řešit. Směsný biofilm tvořený sinicí Synechocystis, která produkuje O_2 a bakterií Pseudomonas, která O_2 spotřebovává, pěstovaný v kapilárním reaktoru, byl schopen konvertovat cyklohexan na cyklohexanol v objemu 3,76 $g.m^{-2}den^{-1}$ a udržet produkci po dobu jednoho měsíce [6].

Využití biofilmů v zemědělství

Soužití rostlin, resp. jejich kořenů, s půdními bakteriemi, je známo dlouho, ale výzkum v oblasti cíleně vytvářených nebo přirozených biofilmů je poměrně nedávného data. Pozornost se soustřeďuje na vícedruhové biofilmy, jejichž základem jsou autotrofní cyanobakterie schopné tvořit vlákna. Ty vytvářejí jednak strukturní základ, jednak jsou schopné poskytovat dalším členům bakteriálního společenstva organické látky vytvářené v procesu fotosyntézy. Dalšími důležitými složkami těchto biofilmů jsou bakterie vážící vzdušný dusík nebo chemolitotrofní bakterie, schopné uvolňovat zásadní biogenní prvky jako síra nebo fosfor z minerálů. Využití takových biofilmů výrazně zlepšuje zásobení rostlin živinami a může nahrazovat umělá hnojiva. Kromě toho se ukázalo, že zlepšuje strukturu půdy a zadržování vody, což je velmi důležité v situaci, kdy čelíme nutnosti adaptovat se na klimatickou změnu.

Bioremediace

Bioremediace je definována jako proces, v němž jsou působením živých organismů přeměňovány látky toxické na netoxické. Vzhledem k tomu, jaká spoušť často za člověkem zůstává, je pomoc bakteriálních biofilmů v této oblasti nedocenitelná. Bioelektrické články založené na biofilmu se využívají k odstraňování těžkých kovů z prostředí. Bakteriální biofilmy se ukazují být neocenitelnými pomocníky při recyklaci elektronického odpadu, kterého naše společnost vyprodukuje až 50 mil tun ročně [7]. Jedním z charakteristických rysů současnosti je všudypřítomné rozšíření plastů, které velmi rychle skončí v podobě mikroplastů a jako globální polutant zamořují celou biosféru. V přírodním ekosystému však žádná nika nezůstane neosídlená, a tak i povrchy mikroplastů jsou kolonizovány mikroorganismy „plastisféry" tvořícími biofilmy. Najdeme zde autotrofní cyanobakterie (*Nostoc, Scytonemal*) nebo řasy (*Navicula, Cyclotella*) v kombinaci s heterotrofními bakteriemi tříd Gamma- a Alphaproteobacteria. Tyto biofilmy sekretují nejrůznější enzymy, které dokáží mikroplasty rozkládat, a kromě toho jsou schopny katalyzovat jejich konverzi na polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA mohou být využity k výrobě plnohodnotných náhrad plastů založených na ropných derivátech [8]. Ještě údernější jsou některé houby, které ani nečekají, až se plasty rozpadnou na mikroplasty. Řada hub kmene Ascomycota je schopná se uchytit na povrchu různých syntetických polymerů (PEE, PES, PVC atd), vytvořit biofilm a vylučovat různé enzymy schopné degradovat plast. V řádu měsíců dojde k mineralizaci plastových polymerů na neškodný produkt [9].

Bezprostřední hrozbou, které lidstvo čelí, je antibiotická (ATB) rezistence, kterou ještě výrazně potencujeme bezstarostným vypouštěním obrovského množství antibiotik do prostředí a proto technologie, které umožňují jejich eliminaci, jsou nesmírně důležité. V minulém čísle jsme psali o biofilmech, které akumulují geny pro ATB rezistenci, naopak zde chceme upozornit na biofilmy, které dokáží ATB degradovat a používají se pro čištění odpadních vod. Úspěšně se k tomuto účelu využívají smíšené biofilmy mikroskopických řas a bakterií [10]. Výčet situací, kdy mikroorganismy a jejich biofilmy pomáhají, obrazně řečeno, hasit požáry založené člověkem, by mohl být velmi, velmi dlouhý a zasloužil by si další samostatné číslo Mikrobio(m)novin.

Biofilmy a materiálové inženýrství

Bakterie rostoucí v biofilmu mohou ve srovnání s planktonicky rostoucími bakteriemi získat některé nové vlastnosti. *Acetobacter xylinum* se využívá k produkci celulózy. Produkce v biofilmovém reaktoru vede k vyšším výtěžkům než ve volně rostoucí kultuře, ale odlišné jsou i vlastnosti produkované celulózy. Mechanická odolnost materiálu, vyjádřená pomocí Youngova modulu, je u celulózy produkované bakterií v biofilmu 10x vyšší (2,4 GPa) než u celulózy produkované stejnou bakterií v planktonické kultuře. Pomocí biofilmů je možné vytvořit i vrstvu „biobetonu". Povrch mikroorganismů často nese negativní náboj, což vede k akumulaci kationtů, např. Ca^{2+}. Vápenaté ionty se váží do $CaCO_3$, který za podmínek supersaturace precipituje (microbially induced calcium carbonate precipitation, MICP).

MICP lze využít ke zpevňování půd, opravám betonových konstrukcí, vychytávání a uskladňování CO_2, ale třeba také při vytváření kostních náhrad [11].

Uvedený přehled je pouze anekdotický výčet příkladů, kdy jsou bakterie rostoucí v biofilmu pro člověka jednoznačně prospěšné. Rozhodně je tedy zapotřebí opustit paradigma biofilm = nebezpečí a začít hledat způsoby, jak nesmírné možnosti skrývající se v zázraku jménem biofilm využít. A vzhledem k hrozivě se blížící klimatické, potravinové a dalším krizím bychom s tím neměli otálet.

Monika Cahová

Literatura:

[1] Al-Mamun, A., Ahmad, W., Baawain, M. S., Khadem, M., & Dhar, B. R. (2018). A review of microbial desalination cell technology: configurations, optimization and applications. Journal of Cleaner Production, 183, 458-480.

[2] Vidales, A. G., Bruant, G., Omanovic, S., & Tartakovsky, B. (2021). Carbon dioxide conversion to C1-C2 compounds in a microbial electrosynthesis cell with in situ electrodeposition of nickel and iron. Electrochimica Acta, 383, 138349.

[3] Ramírez-Vargas, C. A., Prado, A., Arias, C. A., Carvalho, P. N., Esteve-Núñez, A., & Brix, H. (2018). Microbial electrochemical technologies for wastewater treatment: principles and evolution from microbial fuel cells to bioelectrochemical-based constructed wetlands. Water, 10(9), 1128.

[4] Kumar, T., Naik, S., & Jujjavarappu, S. E. (2022). A critical review on early-warning electrochemical system on microbial fuel cell-based biosensor for on-site water quality monitoring. Chemosphere, 291, 133098.

[5] McCormick, A. J., Bombelli, P., Scott, A. M., Philips, A. J., Smith, A. G., Fisher, A. C., & Howe, C. J. (2011). Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (BPV) system. Energy & Environmental Science, 4(11), 4699-4709.

[6] Hoschek, A., Heuschkel, I., Schmid, A., Bühler, B., Karande, R., & Bühler, K. (2019). Mixed-species biofilms for high-cell-density application of Synechocystis sp. PCC 6803 in capillary reactors for continuous cyclohexane oxidation to cyclohexanol. Bioresource technology, 282, 171-178.

[7] Bharathi, S. D., Dilshani, A., Rishivanthi, S., Khaitan, P., Vamsidhar, A., & Jacob, S. (2023). Resource recycling, recovery, and xenobiotic remediation from e-wastes through biofilm technology: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology, 195(9), 5669-5692.

[8] Behera, S., & Das, S. (2023). Environmental impacts of microplastic and role of plastisphere microbes in the biodegradation and upcycling of microplastic. Chemosphere, 138928.

[9] Khatua, S., Simal-Gandara, J., & Acharya, K. (2023). Myco-remediation of plastic pollution: current knowledge and future prospects. Biodegradation, 1-31.

[10] Iyobosa, E., Wang, R., & Zhao, J. (2023). Antibiotic removal by microalgae-bacteria consortium: Metabolic pathways and microbial responses. Science of The Total Environment, 164489.

[11] Saracho, A. C., Lucherini, L., Hirsch, M., Peter, H. M., Terzis, D., Amstad, E., & Laloui, L. (2021). Controlling the calcium carbonate microstructure of engineered living building materials. Journal of Materials Chemistry A, 9(43), 24438-24451.

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

Sliby se mají plnit, a tak vás dnes čeká třetí generace sekvenování. Podíváme se na ni z úhlu metodického, tedy si řekneme, jak to funguje a příště se podíváme na praktické zkušenosti s jejich využitím v mikrobiomových studiích. Protože, a teď spojleruji, příští číslo Mikrobio(m)novin nebudu psát já, ale lidé, kteří mají se sekvenováním třetí generace rozsáhlé praktické zkušenosti, máme se skutečně na co těšit!

Sekvenaci třetí generace můžeme také jinak nazývat „single molecule sequencing". Od druhé generace sekvenování, jinak také nazývané „masivní paralelní sekvenování" se liší v několika zásadních ohledech:

- produkuje dlouhá čtení
- nedochází k amplifikaci templátu
- lze číst i modifikace na bázích (epigenetika)

Obecně se dá říci, že sekvenace třetí generace je méně přesná, dražší a pomalejší než generace druhá, ale dokážete s ní analyzovat záležitosti, které jsou pro druhou generaci nemožné. Když jsem se připravovala na jednu přednášku, projížděla jsem i různé blogy o sekvenování a všude se psalo jedno – ve výzkumu už bylo druhou generací osekvenováno vše, co se dalo (aj, to jsem si teď dovolila hodně, že, už vidím zdvižená obočí mnohých výzkumníků, sorry, nebojte, myslím tím samozřejmě všechny ostatní výzkumy, ten Váš je jedinečný, nenahraditelný, úžasný a svět měnící) a nyní bude věk třetí generace. Tak uvidíme. Pojďme si rozebrat jednotlivé obecné znaky sekvenování třetí generace, následně si představíme dva zástupce tohoto směru a zakončíme stručným úvodem, jak by nám to mohlo pomoci ve výzkumu mikrobiomu.

První a zajisté také nejdůležitější znak je sekvenování dlouhých úseků. Zatímco u sekvenování druhé generace je maximální dosažitelná délka čtení 2x300 bp, u třetí generace se dostáváte k délkám nad 10 kb, dle zvolené platformy a kvality DNA lze dosáhnout až 100 kb. To je zajisté zásadní rozdíl, a právě z něj pramení, k čemu se tato metoda využívá. Níže vypsané uplatnění dlouhých readů v analýzách je nejznámější a nejpoužívanější, ale samozřejmě ne jediné.

1. De novo sekvenování – když sekvenujete genom, buď již znáte „předlohu", tedy již někdo daný genom osekvenoval a seskládal a vy jen resekvenujete, tedy zjednodušeně přiřazujete ready k této předloze a díváte se na rozdíly. Stačí vám k tomu menší množství sekvencí a většinou krátké ready. Pokud tuto předlohu nemáte, nebo ji z nějakého důvodu nechcete využít, pak nastupuje tzv. de novo sekvenování, kdy se díky překryvům snažíte seskládat celý genom. Jenomže když máte krátké ready, tak vám práci značně znesnadňují různé repetice a špatně prosekvenované GC bohaté oblasti*.

*V DNA se vždy páruje adenin (A) s thyminem (T) dvojitým vodíkovým můstkem, což je méně stabilní vazba než v případě párování guaninu (G) s cytosinem (C) trojitým vodíkovým můstkem. Tato silnější vazba mezi G a C způsobuje, že se oblasti bohaté na tyto páry při přípravě knihoven hůře fragmentují a tím pádem se hůře sekvenují.

A právě zde nastupuje sekvenování třetí generace se vší parádou a umožní vám seskládat genom lusknutím prstů. Nebo tak nějak. Dobře, samozřejmě i zde narazíte na nějaké ty problémky, zejména pokud vás zajímají složité rostlinné genomy, ale pokud děláte bakteriální genomy, práci to jednoznačně urychlí a zpříjemní.

2. Strukturální varianty – bohužel, v té DNA se pořád něco děje, něco se objeví, něco zmizí a něco dokonce přeskočí někam jinam. A někdy jsou z toho různá onemocnění, a to nechceme. Ke správné diagnóze takovýchto onemocnění může právě přispět osekvenování dlouhého úseku, ze kterého jsou tyto strukturální varianty patrné, na rozdíl od paralelního sekvenování krátkých úseků, kdy je lze snadno přehlédnout [1].

3. Haplotypizace – jak o mě asi už víte, jsem mikrobiolog a tohle úplně není mým šálkem kávy, takže jen zkráceně, pokud sledujete genetické varianty na delších úsecích chromozomů a chcete lépe rozlišit jednotlivé haplotypy a identifikovat genetické varianty spojené s konkrétními chorobami nebo biologickými rysy, tak vám zajisté sekvenování třetí generace usnadní život, pokud ne a zajímá vás to, podívejte se třeba sem [2].

4. Izoformy RNA – samozřejmě se můžeme se sekvenováním třetí generace vydat i do světa transkriptomiky a osekvenovat celé transkripty! Tak můžeme identifikovat i různé izoformy, které vznikají alternativním splicingem. Tedy nejenže dojde před translací RNA do proteinů k odstranění intronů** (konstitutivní splicing), ale alternativní splicing kombinuje introny a exony a tak z jediného genu může vzniknout guláš izoforem RNA a po translaci můžeme pozorovat různé varianty proteinů. Jak vidíte, porozumět složitostem genové exprese a regulace není vůbec žádná sranda. Třetí generace sekvenování také umožňuje detekci nových transkriptů, což je důležité pro objevení nových genů nebo RNA molekul v biologických vzorcích. Kromě toho umožňuje charakterizaci dlouhých nekódujících RNA, což jsou RNA molekuly, které se nepřekládají do proteinů, ale mají důležité regulační role v buňce.

Druhým znakem sekvenování třetí generace je chybějící amplifikace fragmentu, kdy se fragmenty po přidání adapterů (a případných dalších kontrolních krocích) rovnou sekvenují. Zopakujeme si, že u druhé generace si vždy fragment prvně pomnožíme. Tím pádem nám vznikne větší množství stejných fragmentů, u kterých se odečítá signál ve stejný okamžik a je tak silnější. Pokud dojde k individuální chybě, např. když se v klastru fragmentů inkorporuje u jednoho fragmentu místo báze A báze C, ostatní fragmenty se správně inkorporovanou bází to hravě přesvítí. U třetí generace je detektor natolik citlivý, že dokáže rozlišit signál i jen u jednoho fragmentu. A s tím souvisí větší chybovost (i když zase si sem nezavlékáme chyby způsobené PCR), ale také jedna výhoda – a tou je možnost číst i modifikované báze, tedy methylovanou DNA pro studium epigenetiky. To poskytuje hlubší porozumění epigenetickým mechanismům regulace genové exprese, identifikaci nových epigenetických markerů a analýzu dynamiky epigenetických změn v různých biologických procesech a stavech.

** Zatímco exon je část DNA, která nese informaci o tom, jak bude po translaci vypadat budoucí protein, intron je jenom taková jakási výplň mezi exony, jejímiž funkcemi je již zmíněný alternativní splicing, regulace genové exprese a chrání genom před mutacemi.

Na našem trhu jsou zatím dostupné dvě technologie umožňující sekvenování třetí generace.

1. ONT alias Oxford Nanopore Technologies [3]

S tímto sekvenováním má v Česku zkušenost celá řada uživatelů díky chytrému marketingu, kdy v minulosti firma dodávala takový malý přístroj MinION a vy jste si jen pořídili velmi výkonný počítač a samozřejmě jim platili za sekvenační chemii. Slavný MinION si stále můžete koupit za takřka baťovku necelých 50 tisíc a začít sekvenovat své projekty. Tento přístroj je malý a tak si jej v kapse a s výkonným notebookem v baťohu můžete vzít na projekty klidně na Kilimandžáro. I přípravu knihovny se snaží zjednodušit tak, aby byl člověk schopen vytvořit si ji i v polních podmínkách. Můžete si vybrat z celé škály přístrojů, které se liší svým outputem a tak můžete sekvenovat i větší až velké projekty. Další výhodou může být analýza v reálném čase, takže můžete okamžitě zjistit to, po čem toužíte. Například když dáte sekvenovat nějaký genom, můžete hned jak ho identifikujete, dosáhnout dostatečné pokrytí apod. přístroj vypnout a neztrácet čas. Také teoreticky umí, sekvenuje-li něco, co nechcete, tento fragment pustit a začít sekvenovat jiný. Například hledáte–li v krvi pacienta nějaký patogen, nechcete sekvenovat lidskou DNA a tak zadáte, že pokud např. po 400 bp zjistí, že se jedná o lidskou DNA, fragment pustí. Má to ale své limitace, zatím to na papíře funguje trošku lépe než v praxi. Taky narážíte na největší problém veškerého sekvenování – potřebujete hodně dobrého bioinformatika, aby tuto funkci naprogramoval, a jak víme, bioinformatici bohužel nerostou na stromech.

Princip technologie je takový, že fragment DNA prochází nanopórem v membráně. Tím se naruší tok iontů a tyto změny jsou detekovány senzorem a zaznamenávány jako elektrické signály, následně dekódovany a identifikovány jako jednotlivé báze včetně modifikací [4].

2. PacBio [5]

PacBio nyní přichází s novým systémem Revio, který sice nepatří k nejlevnějším, ale zato nabízí široké využití. Pro vyšší přesnost využívá tzv. HiFi ready, kdy se sekvence o vhodné délce cca 15-20 kb zcirkularizuje a sekvenuje se pořád do kolečka, doporučeno je pro dosažení vyšší kvality prosekvenovat každou bázi 8x. Tím se eliminuje chybovost dané technologie. Samotná technologie sekvenování je pro Čechy velmi dobře zapamatovatelná, protože se jmenuje SMRT (single molecule real time). Sekvenace probíhá v tzv. Zero-Mode Waveguide (ZMW) nanojamičkách, které umožňují vysoce senzitivní detekci jedné molekuly DNA. Během sekvenování se jednotlivé báze určují pomocí fluorescenčně značených analogů.

Využití třetí generace v mikrobiomových studiích je velmi široké. Můžete osekvenovat celý bakteriální genom a snadno jej seskládat. Můžete sledovat strukturu mobilních elementů, plazmidů a vlastně i evoluci bakteriálního genomu a to vše včetně genů pro rezistenci k antimikrobiálním látkám nebo

genů virulence a tím přispět k epidemiologickým analýzám či k objevu nových strategií pro ochranu před šířením nebezpečných rezistencí k antimikrobiálním látkám. Můžete sekvenovat celou sekvenci genu pro 16S rRNA [6] a lépe tak rozlišit jednotlivé bakteriální zástupce, nebo provést celometagenomové sekvenování, což opět díky dlouhým čtením umožňuje lepší identifikaci jednotlivých bakterií, ale i funkční potenciál daného společenstva.

Ani dnes mi to nedá a skončím optimisticky. Díky dostupnějším technologiím třetí generace, které stále zlepšují kvalitu svých výsledných dat, se může stát, že o střevním mikrobiomu budeme vědět víc než h…o, pardon, STOLICI.

Petra Vídeňská

Literatura:

[1] Mahmoud, Medhat et al. “Structural variant calling: the long and the short of it.” Genome biology vol. 20,1 246. 20 Nov. 2019, doi:10.1186/s13059-019-1828-7

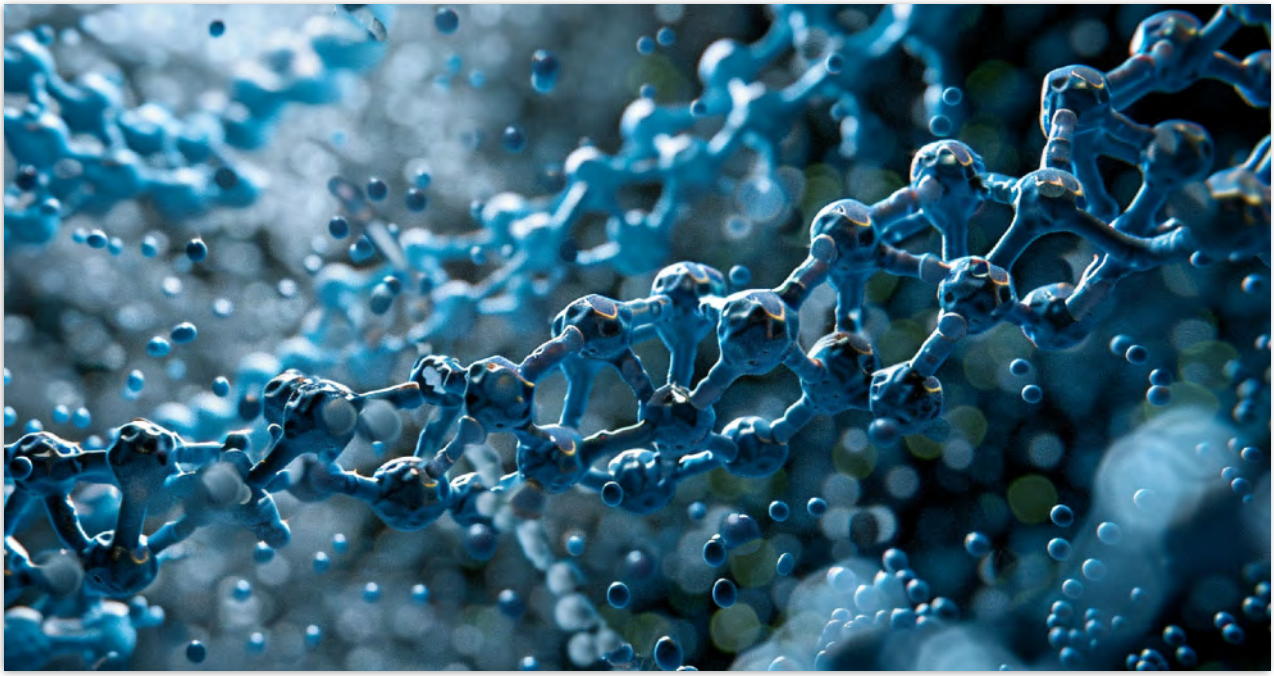
[2] Maestri, Simone et al. “A Long-Read Sequencing Approach for Direct Haplotype Phasing in Clinical Settings.” International journal of molecular sciences vol. 21,23 9177. 1 Dec. 2020, doi:10.3390/ijms21239177

[3] https://nanoporetech.com/

[4] https://nanoporetech.com/platform/technology

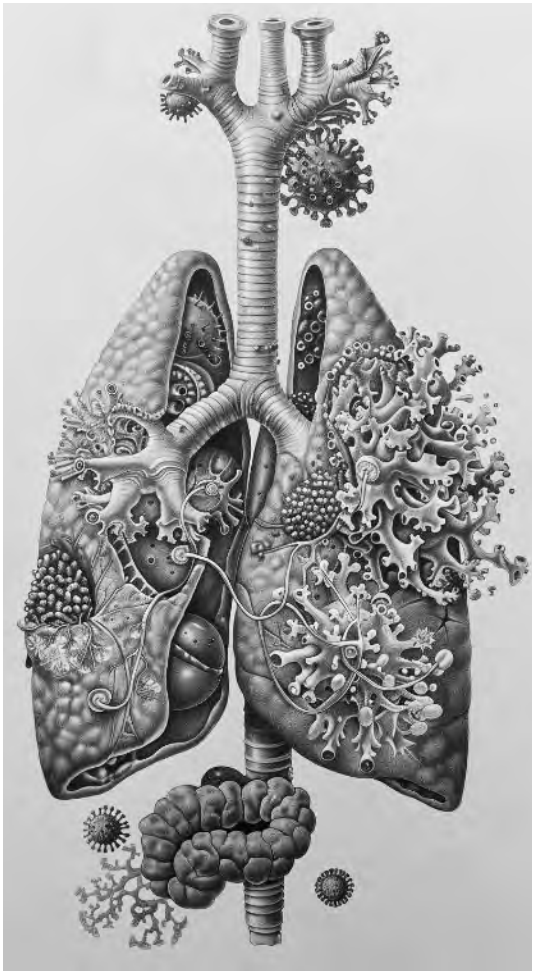
[5] https://www.pacb.com/revio/

[6] https://www.pacb.com/blog/full-length-16s/



Mikrobio(m)novinky a zajímavosti

Mikrobiom pomáhá ve včasné detekci rakoviny plic



Diagnózu „rakovina" si rozhodně netouží vyslechnout nikdo, ale nemalá část populace bohužel tuto nechtěnou zkušenost získá. A když už k tomu dojde, je doslova životně důležité, v jakém stadiu je onemocnění diagnostikováno. Tým Chen et al. už v roce 2021 [1] přišel se zcela novým typem neinvazivního biomarkeru, cirkulující mikrobiomové DNA (circulating microbiome DNA, cmDNA) v krvi, či spíše v plazmě. CmDNA jsou fragmenty DNA uvolňované z mrtvých mikroorganismů nebo přímo mikroorganismy aktivně vylučované. Samozřejmě většinu z nás napadne – jak to, že tato cizorodá molekula není okamžitě eliminována imunitním systémem? Odpovědí jsou pravděpodobně extracelulární vezikuly kryté membránou, které se úspěšně pohybují krevním řečištěm a do značné míry reflektují lidský mikrobiom. Kromě toho, imunitní systém pacientů s rakovinou je často oslaben, což dále usnadňuje přetrvávání cmDNA v cirkulaci.

Ale zpět k diagnostice rakoviny. V dubnu 2024 publikoval tým Haiminga Chena v prestižním časopisu Cell Reports Medicine práci, ve které popisují diagnostický model založený na cmDNA pro detekci časných stadií karcinomu plic. Metodou celogenomového sekvenování analyzovali cmDNA 150 pacientů s rakovinou plic a 165 zdravých kontrol. Na těchto datech sestavili modely, které byly schopné detekovat karcinom plic v různých stadiích s přesností 86.5-93.2 %. Na nezávislé kohortě pacientů ověřili úspěšnost modelu i v predikci rekurence onemocnění po chirurgickém odstranění nádoru (přesnost 80.9 %). Z vědeckého hlediska přináší tato práce velmi zajímavé poznatky týkající se vztahu mikrobiomu a rozvoje plicních nádorů, a to zejména ve vztahu k různým fázím onemocnění. Pro pacienty a jejich ošetřující lékaře je však možná důležitější zpráva, že se objevuje další, a zdá se značně senzitivní diagnostický nástroj. Pokud je rakovina plic diagnostikována ve stádiu I, pravděpodobnost 5ti letého přežití je cca 90%, ve stadiu III-IV se však snižuje na méně než 5%. Zlatým standardem screeningu rakoviny plic je počítačová tomografie, tato metoda je však drahá, vystavuje pacienta relativně vysokým dávkám radiačního záření a je zatížena poměrně vysokým procentem falešně pozitivních výsledků. Naopak diagnostika pomocí cmDNA „z kapky krve" je zcela neinvazivní a je možné ji provádět plošně. Jak autoři sami uvádějí, jejich výsledky byly získány na relativně malém vzorku a převážně na pacientech s jedním typem nádoru (adenokarcinom), takže je třeba dalšího ověření, nicméně alespoň mírný důvod k optimismu to rozhodně je.

Eliška Pivrncová a Monika Cahová

Pro ženy od žen (ale ani muže nediskriminujeme - většinou): Jak vaginální mikrobiom ctí naše kořeny

Na rozdíl od jiných mikrobiomů našeho těla je pro vaginální mikrobiom charakteristická nižší diverzita a častá dominance rodů z čeledi Lactobacillaceae. Přítomné mikroorganismy ovlivňují gynekologické zdraví žen, přičemž jakékoli nerovnováhy mohou vést k řadě zdravotních problémů, včetně bakteriální vaginózy, kvasinkových infekcí nebo u těhotných žen k vyššímu riziku předčasného porodu. Mezi druhy, které bychom z těchto důvodů ve svém vaginálním mikrobiomu raději neviděly, patří *Gardnerella vaginalis*, *Fannyhessea vaginae*, *Megasphaera* spp., *Prevotella* spp. a *Sneathia* spp [2]. Složení vaginálního mikrobiomu je ovlivněno mnoha faktory, jako jsou genetické a fyziologické faktory, hormonální změny, menstruace, těhotenství, menopauza a další onemocnění nebo léčba. V posledních letech se mnoho studií zaměřilo na význam etnicity na složení vaginálního mikrobiomu, protože právě etnicita se ukazuje jako klíčový faktor. Například etnické černošky mají vyšší diverzitu (více druhů, které nespadají do rodu *Lactobacillus*) a tím logicky nižší zastoupení žádoucího rodu *Lactobacillus*, což bývá spojováno s vyšším rizikem předčasného porodu.

V magazínu Cell Reports vyšel článek od autorů Xin et al., 2024 [3], kteří se rozhodli podívat vaginálnímu mikrobiomu trochu více na zoubek (či na vaginální epitel?) a využili k tomu hned tři nezávislé kohorty. První z nich, která byla vytvořena přímo pro tuto studii, obsahovala 351 vzorků od 35 těhotných žen různé etnické příslušnosti. Výsledky následně byly validovány na 462 vzorcích z již existujících dalších dvou kohort tvořených 90 těhotnými i netěhotnými ženami. Potvrdili etnicitu jako nejvýznamnější faktor ovlivňující alfa diverzitu vaginálního mikrobiomu, s tím, že nejvyšší diverzita se vyskytuje u etnických černošek. U etnických černošek a Latinoameričanek byly také častěji zastoupeny druhy *Gardnerella vaginalis* a *Fannyhessea vaginae*.

Z hlediska evoluční adaptace, která byla studována zejména analýzou jednonukleotidových variac u jednotlivých genomů sestavených z dat celometagenomového sekvenování, tzv. MAGs, druh z čeledi Lactobacillaceae vykazují nižší genetickou variabilitu, ale vyšší míru rekombinace, což naznačuje adaptaci na specifické vaginální prostředí dané etnické skupiny. Naopak druhy nepatřící do čeledi Lactobacillaceae mají vyšší genetickou diverzitu a různorodé evoluční strategie - tedy pro to, aby se udržely ve vaginálním prostředí, musí vynakládat větší vynalézavost. Druhy mimo čeleď Lactobacillaceae také vykazují větší rozdíly ve složení mezi etnickými skupinami než samotné druhy Lactobacillaceae. Jako vhodné geny pro studium evoluce a interakce mezi bakteriemi a člověkem se zdají být adhesiny, které napomáhají přilnutí bakterií k vaginální sliznici.

Když trochu zkrátím a zjednoduším to, s čím publikace přichází, tak až se vše potvrdí, dostuduje, zvětší se počet zkoumaných subjektů atd. atp., však to znáte, tak by v budoucnu podle studia dynamiky evolučních procesů šlo odlišit hodné a zlé bakterie a modulací interakcí mezi adhesiny a vaginální sliznicí lze tyto padouchy vyhnat a získat tak nástroj pro preventivní léčbu vaginóz či předcházení předčasných porodů a to ideálně v módu personalizované medicíny dle etnika.

Hana Sechovcová a Petra Vídeňská

Literatura:

[1] Chen, Haiming et al. “Circulating microbiome DNA as biomarkers for early diagnosis and recurrence of lung cancer.” Cell reports. Medicine vol. 5,4 (2024): 101499. doi:10.1016/j.xcrm.2024.101499

[2] Abbe, Carmen, and Caroline M Mitchell. “Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment and prevention.” Frontiers in reproductive health vol. 5 1100029. 31 May. 2023, doi:10.3389/frph.2023.1100029

[3] Wei, Xin et al. “Vaginal microbiomes show ethnic evolutionary dynamics and positive selection of Lactobacillus adhesins driven by a long-term niche-specific process.” Cell reports vol. 43,4 (2024): 114078. doi:10.1016/j.celrep.2024.114078

Mikrobio(m)novinová zpráva k Světovému dni mikrobiomu

Světový den mikrobiomu se každoročně koná 27. června a připomíná význam mikrobiálního světa pro naše zdraví a životní prostředí. Tradici tohoto dne založil výzkumný institut v Corku (APC Microbiome Ireland) [1]. Poprvé se tento den slavil v roce 2018, Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP, z.s. se k oslavám připojuje od roku 2020 a při této příležitosti uskutečnila řadu

vzdělávacích a naučných akcí, které mají za cíl vzdělávat o mikrobiomu a poukázat na jeho význam pro naše zdraví a zdraví celé planety.

Po mikrobiálním putování podél Kunratického potoka v roce 2021, jsme se v následujícím roce 2022 sešli v Královské oboře Stromovka, roku 2023 probíhala část oslav v Muzeu nočníků a historických toalet [2], kde jsme společně s autory Zkvašeno.cz [3] pokřtili jejich novou knihu [4] o přípravě kvašené stravy.

Světový den mikrobiomu je pro nás všechny velkou příležitostí nejen k oslavě fascinujícího mikrobiálního ekosystému, ale také ke zvýšení povědomí o významu mikrobiomu pro naše zdraví a životní prostředí. Je to den, kdy se můžeme dozvědět více o tom, jak o mikrobiom pečovat a jak společně přispět k lepšímu zdraví a kvalitě života.

Zajímavé informace o Světovém dni mikrobiomu naleznete na: https://worldmicrobiomeday.com/

Sledujte akce na našich webových stránkách, sociálních sítích a v Mikrobio(m)novinách.

Tématem letošních oslav je STRAVA A STŘEVNÍ MIKROBIOM, tedy jak správně a zdravě „nakrmit" naše střevní mikroby.

Literatura:

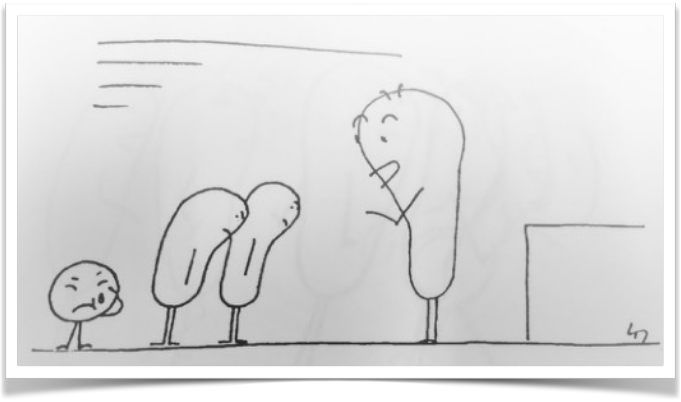
[1] https://www.ucc.ie/en/apc/

[2] https://muzeumnocniku.cz/cs/hlavni-stranka/

[3] https://www.zkvaseno.cz/

[4] https://www.fermentarum.cz/zkvaseno-kucharka-na-doma

Mikrobio - humor



Jako trest každý z vás napíše stokrát: „Micrococcus není fotbalový míč!
A ať vám to rodiče podepíší!

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

Redakční rada Mikrobio(m)novin:

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

Grafické zpracování:

Mgr. Michaela Bartoňová
www.michaelabartonova.cz

Některá ilustrační fota jsou generovaná na Ai a dále výtvarně digitálně zpracovaná

ISSN 3029-5408
Vychází 4-6x/rok

Těšíme se na vaše reakce,

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