

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav mikrobiologie



**Charakterizace bakteriálních druhů a genových markerů  
asociovaných se zvýšeným rizikem sporadického  
kolorektálního karcinomu**

Doktorská disertační práce

**V Olomouci 2022**

**Mgr. Kristýna Mezerová**

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci s názvem „Charakterizace bakteriálních druhů a genových markerů asociovaných se zvýšeným rizikem sporadického kolorektálního karcinomu“ vypracovala samostatně. Všechny použité prameny řádně cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Olomouci dne 8. 4. 2022

.....

Podpis

## Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Vladislavu Raclavskému, Ph.D. za cenné rady, připomínky a odborné vedení při zpracování disertační práce. Poděkování bych chtěla také vyjádřit panu MUDr. Lubomíru Starému, Ph.D. za indikaci pacientů a organizaci odběrů klinického materiálu na chirurgické ambulanci FN v Olomouci. Děkuji rovněž prof. MUDr. Milanu Kolářovi, Ph.D. za poskytnutí pracovního zázemí během celého doktorského studia. Dále bych tímto chtěla vyjádřit poděkování mým kolegům, zejména Bc. Petře Procházkové, Mgr. Taťaně Štosové, Ph.D a Mgr. Vendule Pudové, Ph.D, kteří mi byli nápomocní vždy, když jsem je o to požádala. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a všem mým blízkým, kteří mě během celého doktorského studia podporovali.

Tato práce byla prováděna mj. s podporou grantu MZ ČR (DROFNOI 00098892), AZV ČR (NV19-03-00069), MŠMT ČR DRO (UP, 61989592) a vnitřního grantu LF UP (IGA\_LF\_2018\_019;2019\_21; 2020\_021; 2021\_022).

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>7</b>
1.1	Mikroorganismy asociované s CRC	8
1.2	Bakteriální markery s pro-onkogenním potenciálem	12
1.2.1	Genotoxiny	12
1.2.1.1	Kolibaktin	12
1.2.1.2	CDT	16
1.2.1.3	BFT	17
1.2.2	Toxiny asociované s CRC bez indukce poškození DNA	19
1.2.2.1	CNF	19
1.2.2.2	Cif	21
1.2.2.3	Kandidalyzin	22
1.2.3	Ostatní bakteriální markery asociované s CRC	23
1.2.3.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	23
1.3	Metody screeningu CRC	24
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>28</b>
3.1	Pacienti a klinický materiál	28
3.2	Zpracování vzorků	28
3.3	Genetická analýza izolátů	30
3.3.1	Extrakce DNA	30
3.3.1.1	Hrubá extrakce DNA tepelnou lýzou	30
3.3.1.2	Izolace DNA pomocí DNeasy Blood and Tissue kitu	31
3.3.1.3	Izolace DNA kvasinek pomocí kitu YeaStar Genomic DNA Kit	31
3.3.2	Genetická analýza izolátů <i>Escherichia coli</i>	32
3.3.2.1	Detekce genů kódující toxiny u <i>E. coli</i>	32
3.3.2.2	Gelová elektroforéza	34
3.3.2.3	Klonální analýza kolibaktin-positivních <i>E. coli</i> pomocí RAPD PCR	34
3.3.3	Genetická analýza izolátů <i>Bacteroides fragilis</i>	35
3.3.3.1	Detekce genů kódujících <i>B. fragilis</i> toxin	35
3.3.3.2	Klonální analýza enterotoxigenních <i>B. fragilis</i> pomocí RAPD PCR	35

3.3.4	Genetická analýza izolátů <i>Candida albicans</i> .....	36
3.3.4.1	Detekce genu kódujícího kandidalysin u izolátů <i>C. albicans</i> .....	36
3.3.4.2	Klonální analýza izolátů <i>C. albicans</i> pomocí RAPD PCR.....	36
3.3.5	Vyhodnocení klonální analýzy izolátů pomocí softwaru Gel Compare .....	36
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
4.1	Kultivační detekce.....	37
4.2	Genetická analýza izolátů .....	40
4.2.1	Genetická analýza izolátů <i>Escherichia coli</i> .....	40
4.2.1.1	Statistická analýza detekovaných genů u <i>E. coli</i> od pacientů starších 50 let.....	42
4.2.1.2	Souhrnné modelování využitelnosti potenciálních markerů u pacientů starších 50 let.....	43
4.2.1.3	Klonální analýza pks+ izolátů <i>E. coli</i> pomocí RAPD PCR.....	46
4.2.2	Genetická analýza izolátů <i>Bacteroides fragilis</i> .....	48
4.2.2.1	Detekce enterotoxigenních kmenů <i>B. fragilis</i> .....	48
4.2.2.2	Klonální analýza izolátů druhu <i>B. fragilis</i> pomocí RAPD PCR .....	48
4.2.3	Genetická analýza izolátů <i>Candida albicans</i> .....	49
4.2.3.1	Klonální analýza izolátů <i>C. albicans</i> pomocí RAPD PCR.....	49
<b>5</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>50</b>
5.1	Bakterie asociované s CRC a kontrolní skupinou pacientů .....	50
5.1.1	Bakteriální druhy se zvýšeným výskytem u CRC pacientů.....	50
5.1.1.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	50
5.1.1.2	<i>Bacteroides fragilis</i> .....	50
5.1.1.2.1	Genetická analýza izolátů <i>B. fragilis</i> .....	51
5.1.1.3	Bakterie rodu <i>Clostridium</i> .....	51
5.1.1.3.1	<i>C. perfringens</i> .....	52
5.1.1.3.2	<i>C. ramosum</i> .....	52
5.1.1.4	<i>Candida albicans</i> jako možný, avšak nesignifikanční CRC marker .....	53
5.1.1.5	Potenciál detekce anaerobních bakterií jako CRC markerů .....	53
5.1.2	Bakteriální druhy asociované se zdravou mikroflórou střev .....	55
5.1.2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	55
5.1.2.2	<i>Lactobacillus gasseri</i> .....	55

5.2	Genetická analýza izolátů <i>Escherichia coli</i> .....	56
5.2.1	Role toxinů při vzniku a rozvoji CRC .....	56
5.2.1.1	Kolibaktin u zdravých lidí .....	57
5.2.2	Kombinovaná detekce kolibaktinu a CNF toxinu u CRC pacientů ....	57
5.2.3	Detekce hemolytických <i>E. coli</i> u CRC pacientů.....	58
5.2.4	Potenciál toxinů a hemolýzy u <i>E. coli</i> pro screening CRC.....	58
5.3	Souhrnný potenciál druhových i toxinových CRC markerů .....	58
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKAČNÍ ČINNOST V PRŮBĚHU STUDIA .....</b>	<b>89</b>
9.1	Publikace související s disertační prací .....	89
9.2	Ostatní publikace.....	90
<b>10</b>	<b>SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, GRAFŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>91</b>
10.1	Seznam tabulek .....	91
10.2	Seznam obrázků .....	92
10.3	Seznam grafů.....	92
10.4	Seznam zkratk .....	92
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHA.....</b>	<b>93</b>

## 1 ÚVOD

Mikrobiota člověka je v mnoha ohledech prospěšná svému hostiteli. Plní nezastupitelné funkce, díky kterým s ním může utvářet komplexní fungující biosystém. Nicméně tento úzký vztah přináší také riziko vzniku endogenních infekcí v případě, že dojde k narušení homeostázy. V mnoha studiích byla potvrzena asociace střevních bakterií a jejich metabolitů se vznikem různě závažných gastrointestinálních onemocnění, včetně idiopatických střevních zánětů (ISZ). Pro rozvoj ISZ jsou zřejmě klíčové genetické predispozice spolu se slizničním imunitním systémem jedince (Imhann et al. 2018). Pro úplné porozumění etiopatogeneze onemocnění je však nutné posoudit i roli prozánětlivých střevních bakterií. Je také známo, že u jedinců trpících ISZ je vyšší riziko progresu onemocnění do sporadického kolorektálního karcinomu (CRC) než u zdravých lidí (Ekblom et al. 1990; Langholz et al. 1992; Munkholm 2003; Fantini and Guadagni 2021). Přítomnost zánětu ve střevě zvyšuje riziko vzniku CRC a zjištění příčin zánětů proto patří mezi důležité cíle mnoha studií.

Kromě toho byly v mnoha publikacích s určitým složením mikroflóry tlustého střeva asociovány procesy, vedoucí k mutagenезi onkogenů a tumor supresorových genů v buňkách střevní sliznice (Schwabe and Jobin 2013; Warren et al. 2013; Compare and Nardone 2014). Bakterie a jejich metabolity se mohou účastnit iniciace a progresu CRC různými mechanismy. Mezi zmíněné mechanismy patří např. aktivace prozánětlivých a pro-onkogenních drah v epiteliálních buňkách, produkce reaktivních forem kyslíku a konverze prokancerogenních sloučenin v kancerogeny (Bonnet et al. 2014). Existuje však také řada studií popisující pozitivní asociaci bakteriálních genotoxinů s CRC, které mohou modulovat buněčnou diferenciaci, proliferaci a apoptózu (Lax and Thomas 2002).

## 1.1 Mikroorganismy asociované s CRC

CRC je multifaktoriální onemocnění, proto je velmi těžké objasnit celý proces vedoucí k rakovině střeva od tzv. spouštěče, přes vývoj až k progresi tohoto zhoubného nádoru. Řada studií se zabývá otázkou, jakou roli při tom hraje střevní mikrobiota a jestli někteří její zástupci nebo jejich metabolity mohou přispívat k rozvoji CRC významněji než jiní. Ve srovnání se střevní mikrobiotou zdravého jedince byla ve střevní sliznici postižené nádorem pozorována vyšší četnost některých bakteriálních druhů. Důvody pro vyšší zastoupení těchto bakterií u CRC pacientů však nejsou jasné. Srovnání výsledků z publikací zabývajících se analýzou bakteriálních druhů ve střevní tkáni CRC pacientů oproti střevnímu mikrobiomu zdravých jedinců je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1. Srovnání bakteriálních druhů asociovaných s CRC pacientů v různých studiích.

Soubor identifikovaných bakterií	Typ klinického materiálu	Metoda detekce	Reference
<i>Enterococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i>	Stolice	454 pyrosekvence a 16S rRNA sekvenace, analýza dat za použití nástroje MOTHUR a SILVA databáze	(H.-M. Chen et al. 2013)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Leptotricha hofstadii</i> <i>Campylobacter showae</i> <i>Selenomonas sputigena</i>	Tkáň z tumoru (biopsie z kolonoskopie)	16S rRNA sekvenace, Novoalign parování s následnou analýzou v nástroji Cytoscape v2.8.2	(Warren et al. 2013)
<i>Porphyromonas assaccharolytica</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Clostridium symbiosum</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Stolice a tkáň z tumoru	Metagenomická a 16S rRNA sekvenace, analýza dat za použití nástroje MOCAT a USEARCH	(Zeller et al. 2014)
<i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Bacteroides ovatus</i> <i>Parabacteroides distasonis</i> <i>Parabacteroides merdae</i> <i>Alistipes putredinis</i> <i>Bilophila wadsworthia</i> <i>Lachnospiraceae bacterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Clostridium symbiosum</i> <i>Fusobacterium sp.</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Stolice	Metagenomická sekvenace a analýza dat za použití IMG databáze a <i>in house</i> metody	(Feng et al. 2015)



Soubor identifikovaných bakterií	Typ klinického materiálu	Metoda detekce	Reference
<i>Porphyromonas assaccharolytica</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella sp.</i> <i>Prevotella sp.</i>	Stolice	16S rRNA sekvenace za použití random forest modelu	(Baxter et al. 2016)
<i>Porphyromonas assaccharolytica</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium sp.</i> <i>Parvimonas sp.</i> <i>Porphyromonas sp.</i> <i>Clostridium XI</i> <i>Escherichia sp.</i> <i>Ruminococcus sp.</i> <i>Dorea sp.</i> <i>Blautia sp.</i> <i>Weissella sp.</i>	Stolice a tkáň z tumoru	16S rRNA sekvenace, metaanalýza datasetů ze 14 publikací, analýza dat za použití random forest modelu	(Sze and Schloss 2018)
<i>Porphyromonas assaccharolytica</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Prevotella copri</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Clostridium SS2</i> <i>Eubacterium hallii</i> <i>Streptococcus vestibularis</i>	NA	Metaanalýza dostupných datasetů z ENA a NCBI databází za použití random forest modelu	(Ai et al. 2019)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Clostridium symbiosum</i> <i>Anaerococcus vaginalis</i> <i>Anaerococcus obesiensis</i> <i>Porphyromonas assaccharolytica</i> <i>Porphyromonas somerae</i> <i>Porphyromonas uenonis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Granulicatella adiacens</i>	Stolice	Metaanalýza 5 datasetů z publikací: (Zeller et al. 2014; Yu et al. 2017; Feng et al. 2015(Vogtmann et al. 2016; Hannigan et al. 2017)) a ze 2 kohortních studií za použití nástroje MetaPhlan2 a random forest modelu	(Thomas et al. 2019)

Soubor identifikovaných bakterií	Typ klinického materiálu	Metoda detekce	Reference
<i>Parvimonas micra</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Porphyromonas uenonis</i> <i>Clostridium symbiosum</i> <i>Unknown Porphyromonas</i>	Stolice	Metagenomická sekvenace vlastních vzorků a metaanalýza dat zahrnující další kohortní studie za použití nástroje MOCAT, LASSO regresní analýz, atd.	(Wirbel et al. 2019)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Neisseria sp.</i> <i>Porphyromonas sp.</i> <i>Prevotella sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i>	Tkáň z tumoru	16S rRNA sekvenace, analýza dat za použití nástroje STAMP a QIIME	(Zorron Cheng Tao Pu et al. 2020)

Pro snadnější pochopení vysoké prevalence některých bakterií u CRC pacientů byl formulován tzv. „driver-passenger“ model, podle kterého jsou bakterie asociované s CRC zařazeny do dvou skupin (Tjalsma et al. 2012). Bakterie, které svou aktivitou (produkcí toxinů a jiných faktorů) přímo nebo nepřímo způsobují poškození DNA vedoucí k aktivaci pro-onkogenů nebo k inhibici tumor supresorových genů, a tedy iniciující CRC, jsou řazeny mezi „drivery“. Do této skupiny bakterií patří např. genotoxické kmeny *E. coli*, enterotoxigenní kmeny *Bacteroides fragilis* nebo producenti superoxidu, *Enterococcus faecalis*. Skupina „passenger“ bakterií se vyskytuje ve vyšší míře v tkáních s již rozvinutým tumorem. Jedná se o bakterie, které využívají tumorigenní mikroprostředí ve svůj prospěch, avšak vznik tumoru by primárně způsobovat neměly (Candela et al. 2014). Některé „passenger“ bakterie dokonce mohou celý proces tumorigeneze inhibovat, nicméně jiné mohou růst tumoru dále podněcovat, proto se uvažuje o přearazení těchto bakterií do „driver“ skupiny. Jedná se např. o bakteriální rod *Fusobacterium*, který bývá často detekován ve tkáních CRC. O přearazení fusobakterií do skupiny podněcující vznik CRC se uvažuje kvůli jejich schopnosti produkovat adheziny vázající E-kadherin v CRC buňkách, což vede k zánětu a celkové podpoře rozvoje CRC (Rubinstein et al. 2013).

Protože neexistuje přesná hranice mezi „driver“ a „passenger“ bakteriemi, je nezbytné pokračovat ve snaze o objasnění kauzality ve vztahu bakterie-CRC. Zároveň by mohly

být detekované bakterie nebo jejich metabolity asociované s CRC nápomocné také při zavedení nových diagnostických metod, neboť detekce těchto bakteriálních markerů ve střevě by mohla sloužit jako neinvazivní metoda screeningu CRC. Nejlepším řešením se jeví analýza celé mikrobiální komunity obývající střeva nemocných pomocí metagenomických nebo genotypových metod. Studie zabývající se možností stanovení konkrétních bakteriálních druhů sloužících jako biomarkery CRC jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Bakteriální druhy s potenciálem sloužit jako CRC markery dle jednotlivých studií.

Bakteriální druh	Reference
<i>Clostridium symbiosum</i>	(Wirbel et al. 2019) (Thomas et al. 2019) (Xie et al. 2017)
<i>Clostridium hathewayi</i>	(Thomas et al. 2019)
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	(Thomas et al. 2019) (Ai et al. 2019)
<i>Anaerococcusobesiensis vaginalis</i>	(Wirbel et al. 2019)
<i>Gemella morbillorum</i>	(Wirbel et al. 2019) (Thomas et al. 2019)
<i>Parvimonas species</i>	(Wirbel et al. 2019) (Ai et al. 2019)
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	(Thomas et al. 2019)
Enterotoxické kmeny <i>Bacteroides fragilis</i>	(Haghi et al. 2019) (Viljoen et al. 2015) (Bao et al. 2019) (Purcell et al. 2017)
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	(Thomas et al. 2019) (Ai et al. 2019)
<i>Prevotella intermedia</i>	(Wirbel et al. 2019)
<i>Prevotella copri</i>	(Thomas et al. 2019)
<i>Escherichia coli</i>	(Thomas et al. 2019)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	(Wirbel et al. 2019) (Thomas et al. 2019) (Ai et al. 2019) (Tunsjø et al. 2019) (Zorron Cheng Tao Pu et al. 2020) (Mangifesta et al. 2018) (Xie et al. 2017)

Pro vyšší specifitu screeningu CRC by však bylo vhodnější zmíněné genotypové metody zkombinovat s konvenčními metodami umožňující charakterizaci jednotlivých bakteriálních druhů, u kterých by byly následně identifikovány bakteriální faktory s pro-onkogenní aktivitou. Na základě výskytu těchto faktorů u CRC vs. zdravých kontrol by byly stanoveny jejich kombinace sloužící jako citlivé CRC markery. Pro tento účel by mohly ideálně sloužit mj. genotoxiny produkované kmeny bakterií, které se ve vyšší míře vyskytují ve střevech CRC pacientů.

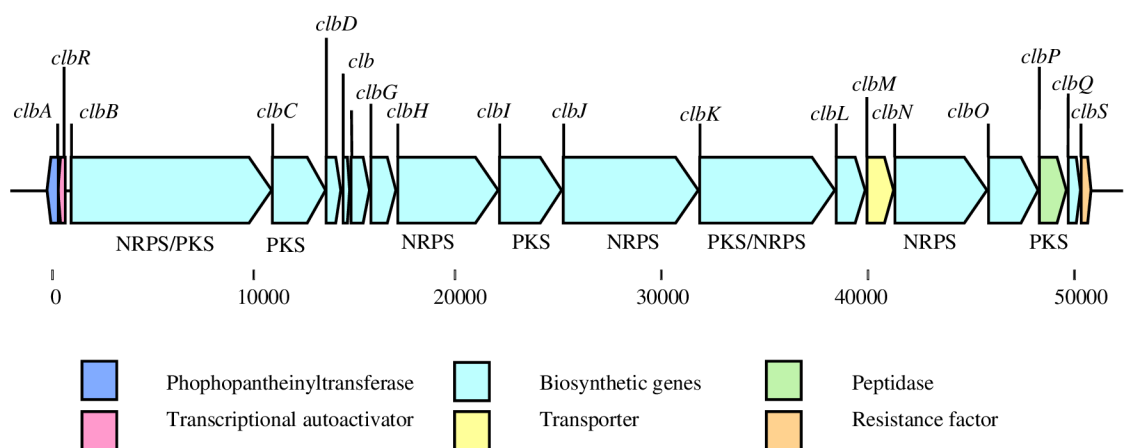
## 1.2 Bakteriální markery s pro-onkogenním potenciálem

### 1.2.1 Genotoxiny

#### 1.2.1.1 Kolibaktin

Mezi nejvýznamnější genotoxiny patří kolibaktin, u kterého byl v kombinaci se zánětlivým prostředím střev popsán kancerogenní účinek. U kolibaktinu byla prokázána schopnost indukovat dvouřetězcové zlomy DNA („double-strand breaks“ DSBs) v eukaryotických buňkách *in vitro* a *in vivo*, což vede k inkompletním reparacím DNA, chromozomálním aberacím a zástavě buněčného cyklu ve fázi G2/M (Nougayrede 2006; Cuevas-Ramos et al. 2010). Jedná se o peptido-polyketidovou strukturu, která je kódována genomickým ostrovem pks o velikosti 54 kb. Tento ostrov patogenity nese geny *clbA-S* kódující tři neribosomální peptidy (NRPS: ClbH, ClbJ, ClbN), tři polyketidy – syntázy (PKS: ClbC, ClbI, ClbO), dvě hybridní molekuly NRPS/PKS syntázy (ClbB, ClbK) a devět pomocných proteinů (Nougayrede 2006). Schématicky je organizace tohoto genotoxického ostrovu znázorněna na Obr. 1.

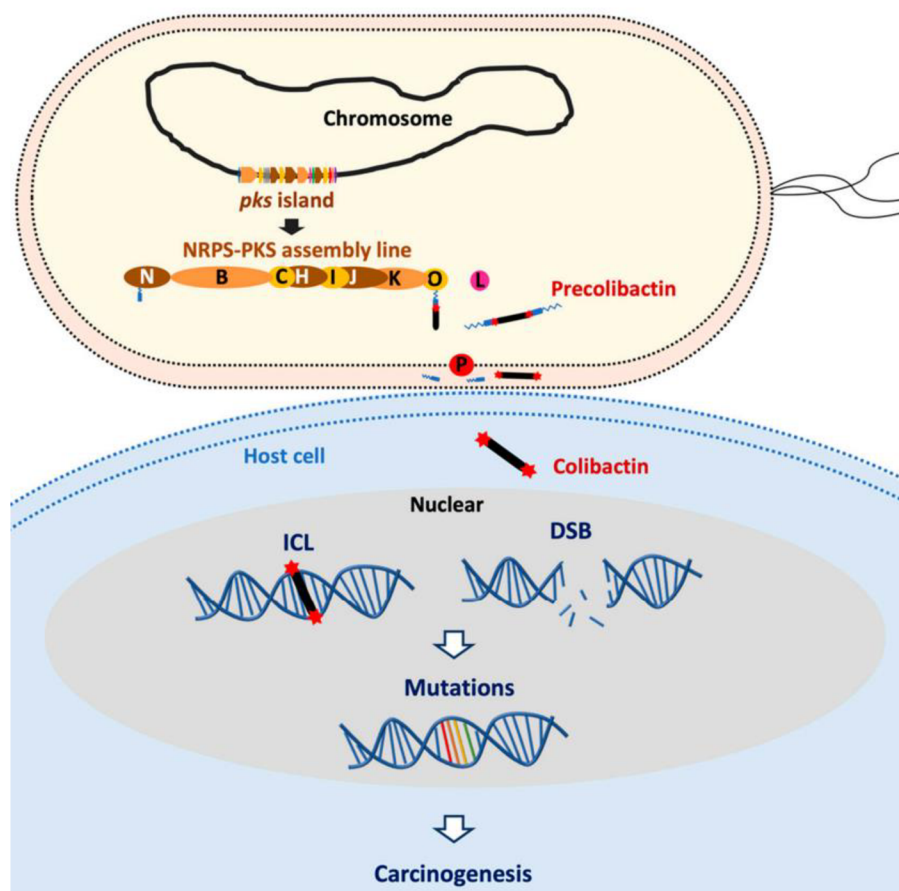
Obr. 1 Genetická organizace pks ostrovu *E. coli* M1/5 (převzato z Wami et al. 2021)



Všechny geny *clb* kódují produkty nezbytné pro regulaci a aktivaci biosyntézy kolibaktinu (zejména geny *clbA* a *clbR*), pro jeho transport nebo pro rezistenci buňky *E. coli* vůči němu samotnému (protein ClbS) (Bossuet-Greif et al. 2016; Wami et al. 2021). Po hlubší genetické analýze ostrovu pks byly v genovém klastru *clb* detekovány dvě oblasti s nižším obsahem GC, přičemž jedna z nich náleží regionu s geny *clbA* a *clbR*, zahrnující také rekombinační místo, které je umístěno před genem *clbB* nebo přímo zasahuje do oblasti tohoto genu. Zajímavé je, že mezi geny *clbR* a *clbB* byly detekovány variabilní tandemové repetice (VNTR), jejichž počet kopií se však neliší v závislosti na sekvenčním typu (ST) testované *E. coli* (Wami et al. 2021).

Chemická struktura kolibaktinu byla studována od jeho objevení roku 2006, avšak nestabilita izolovaného proteinu dlouho bránila jeho kompletní analýze. Až v roce 2019 za pomoci všech dostupných metod, zahrnující chemickou syntézu, tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS), metody využívající značení izotopů a genetické a bioinformatické analýzy, byla popsána kompletní struktura kolibaktinu (Xue et al. 2019). Dalším zlomem byl v roce 2019 poznatek, že kolibaktin je schopen alkylovat DNA *in vivo* a generovat DNA adukty jako jsou meziřetězcové spoje („inter-strand crosslinks“; ICLs) v infikovaných buňkách, s vysokou pravděpodobností tvořit mutace, pokud buňka není opravena správně (Wilson et al. 2019). Nestabilní ICLs procházejí depurinací s následnou eliminací 3'-fosfátu. Vzniklé depurinované oblasti jsou akumulovány a rozpoznávány restriční endonukleázou štěpící DNA v daném místě. Pomalá a postupná defosforylace by mohla být příčinou tvorby simultánně vznikajících DSBs, které byly u buněk vystavených kolibaktinu pozorovány (Xue, Wernke, and Herzon 2020). Všechny tyto objevy významně přispívají k pochopení mechanismu genotoxického působení kolibaktinu (Obr. 2.).

Obr. 2. Shrnutí mechanismu účinku kolibaktinu (převzato z Tang-Fichaux et al. 2021).



Kolibaktin způsobuje ICLs, které jsou během procesu depurinace nebo snahy o reparaci DNA konvertovány na DSBs. Následuje tvorba mutací a aktivace kancerogeneze.

Obrovským přínosem byl také experiment, ve kterém byla získána sloučenina kolibaktin-645, a to pomocí inkubace největšího známého derivátu kolibaktinu, tzv. prekolibaktinu-969, s *E. coli* produkující peptidázu nezbytnou pro maturaci kolibaktinu. Kolibaktin-645 je makrocyclická sloučenina přímo indukující DSBs v DNA *in vitro*, a to oxidativním štěpením při oxidoredukční reakci s  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (Z.-R. Li et al. 2019). Přesto že je díky *in silico* modelům nebo sekvenaci BLISS o kolibaktinu už známo, že působí dvouřetězcové zlomy zejména v oblasti DNA bohaté na A a T (Yan et al. 2017), způsob opravy DNA v dané oblasti je stále předmětem bádání. Při reparaci zřejmě záleží na fázi buněčného cyklu, stále ale není znám přesný princip a další konkrétní dopady na exponovanou buňku (Dziubańska-Kusibab et al. 2020).

Pro-onkogenní aktivita kolibaktinu daná jeho genotoxickým působením byla demonstrována v mnoha studiích. Transformace do premaligní formy byla pozorována u zdravých epiteliálních buněk po krátkodobé expozici kmenu *E. coli* produkujícímu kolibaktin. Výsledkem byl organoid s nekontrolovaným růstem, nezávislým na signální dráze Wnt (Iftekhar et al. 2021). Wnt signální dráha je asociována se střevními tumory,

přičemž aberantní Wnt signalizace byla prokázána u 93 % tumorů rekta (Muzny et al. 2012; Aghabozorgi et al. 2020). Role kolibaktinu při procesu vzniku a rozvoje CRC je diskutována také kvůli častější detekci kmenů *E. coli* produkujících kolibaktin u pacientů s CRC oproti zdravým kontrolám (Iyadorai et al. 2020). Díky vyšší prevalenci kolibaktinu u bakterií izolovaných od pacientů s CRC oproti zdravým jedincům roste snaha validovat kolibaktin jako genový marker CRC.

Pks ostrov patogenity je pravděpodobně šířen cestou horizontálního genového přenosu primárně mezi kmeny bakterie *E. coli* (Putze et al. 2009). Tyto pks+ *E. coli* nejčastěji patří do fylogenetické skupiny B2, u které lze detekovat širokou škálu genů kódujících faktory virulence (J. R. Johnson et al. 2008). Bylo také prokázáno, že se nejčastěji jedná o kmeny difuzně adherentní *E. coli* (DAEC), které musí být v kontaktu se sliznicí tlustého střeva, aby byl pozorován proonkogenní účinek kolibaktinu (Prorok-Hamon et al. 2014). Nicméně záleží také na řadě dalších faktorů, jako je např. množství produkovaného kolibaktinu, doba expozice v místě, kde tento genotoxin působí, nebo regulace exprese kolibaktinu (Nougayrede 2006).

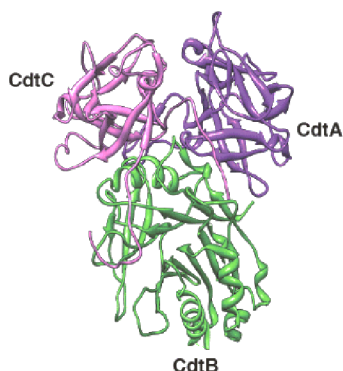
Expresní analýza genového klastru kolibaktinu již v roce 2006 odhalila ko-transkripci genů *clbA* a *clbR*. Produkt genu *clbA*, fosfopantetein transferáza, je jeden z nejdůležitějších proteinů podílejících se na posttranslační aktivaci PKS a NRPS vedoucí k jejich syntéze. Nepatrná regulace proteinu ClbA prostřednictvím genu *clbR*, který kóduje transkripční aktivátor LuxR, může významně ovlivnit výslednou expresi kolibaktinu (Homburg et al. 2007). Později byla potvrzena role proteinu ClbR jako jediného dosud známého transkripčního aktivátoru, který je schopen efektivně a specificky regulovat produkci kolibaktinu. Jak již bylo zmíněno u popisu genetické organizace pks ostrovu, gen *clbR* se nachází v blízkosti VNTR (Wami et al. 2021), jejichž délka a počet ovlivňuje míru transkripce *clbR*. Při zesílení exprese genu *clbR* nebo při jeho delecí nebyla detekována změna u transkripce genů mimo pks ostrov, což potvrzuje specifitu tohoto transkripčního aktivátoru. Kromě specifity regulace genu *clbR*, vztahující se pouze na pks ostrov, byla v experimentu pozorována také schopnost přímé regulace míry produkce kolibaktinu v závislosti na over-expresi nebo delecí genu *clbQ*. (Wallenstein et al. 2020). Produkt genu *clbQ* je tioesteráza typu 2, jejíž delece vede k redukci cytotoxického působení kolibaktinu (Guntaka et al. 2016). Vzhledem k tomu, že biosyntéza a následná produkce kolibaktinu je kaskádovitý proces, v němž je zahrnuto nespočet vnějších faktorů a v neposlední řadě i vliv genové regulace exprese genotoxinu, je pro-onkogenní aktivita kolibaktinu sice potvrzena, ale stále je třeba dalších výzkumů

zaměřujících se na ko-faktory produkce a genotoxického působení kolibaktinu v lidských střevních epitelálních buňkách.

### 1.2.1.2 CDT

Tepelně labilní cytoletální toxin (CDT) produkovaný izoláty *E. coli* a *Campylobacter* sp. byl poprvé popsán již v roce 1988 (W. M. Johnson and Lior 1988). U tohoto toxinu byla pozorována schopnost blokace buněčného cyklu na rozhraní G2/M fáze, v jejímž důsledku dochází k zástavě růstu buňky a následně k její apoptóze (Whitehouse et al. 1998; Pérès et al. 1997). Na molekulární úrovni se CDT skládá ze tří proteinů, CdtA, CdtB a CdtC (Obr. 3.), jejichž sekvenční homologie se liší v závislosti na bakteriálním druhu. Gen kódující protein CdtB je ze všech tří největší (819 bp), následuje *cdtA* (711 bp) a *cdtC* (570 bp) (Scott and Kaper 1994). Všechny tři geny se vzájemně překrývají a jsou umístěny na chromozomu. Nicméně později byl popsán také plazmidově kódovaný *cdt-III* genový klastr, který byl detekován spolu s genem pro cytotoxický nekrotizující faktor (CNF) (Pérès et al. 1997).

Obr. 3. Krystalická struktura holotoxinu CDT (převzato z publikace Grasso and Frisan 2015)



Přestože je známo pět variant CDT alel, pro cytotoxickou aktivitu je vždy nutná exprese všech tří *cdtA-C* genů (Pickett et al. 1994; Scott and Kaper 1994). Podjednotky CdtA a CdtC jsou zodpovědné za translokaci podjednotky CdtB do hostitelské buňky, kde může následně tento genotoxin působit. CdtB protein, který indukuje poškození DNA v infikované buňce, vykazuje homologii s lidskou DNázou I, což vysvětluje nukleázovou aktivitu CDT *in vitro* a *in vivo* (Frisan, Cortes-Bratti, and Thelestam 2001; Nešić, Hsu, and Stebbins 2004; Elwell and Dreyfus 2000). Působením CDT jsou indukované jednořetězcové zlomy DNA, které jsou následně v S fázi konvertovány do DSBs (Fedor et al. 2013). Buněčný cyklus je poté zastaven v G2/M fázi a následován apoptózou



postižené buňky (Whitehouse et al. 1998; Pérès et al. 1997; Jinadasa et al. 2011). CDT je schopen blokovat buněčný cyklus ireverzibilně v závislosti na typu postižené buňky (L. Q. Li et al. 2002; Fedor et al. 2013; Scott and Kaper 1994; Whitehouse et al. 1998). Navíc byla u působení CDT pozorována schopnost indukovat DSBs také v neproliferujících buňkách (Hassane, Lee, and Pickett 2003; L. Q. Li et al. 2002). Tvorba těchto DSBs aktivuje mechanismy reparace DNA (DNA damage response; DDR) vyhýbající se replikaci, což vede ke genetické nestabilitě buňky poskytující možnost vzniku a promoce tumoru (Fahrer et al. 2014; Shiloh 2001).

Genotoxické působení CDT se zdá být významným faktorem při rozvoji preneoplastických lézí asociovaných se zánětlivým mikros prostředím (Ge et al. 2007). Tumorigenní účinek CDT byl pozorován také u myši infikovaných klinickým humánním izolátem *Campylobacter jejuni* produkujícím CDT. Ve střevním epitelu nemocných myši byla detekována zesílená exprese nukleárního  $\beta$ -kateninu. Nadprodukce tohoto proteinu je dána utlumením exprese známého tumor supresoru APC, což je asociováno s CRC (He et al. 2019). Podle dosavadních studií však CDT přímo neinicuje CRC, ale může být jeho významným promotorem (Graillot et al. 2016).

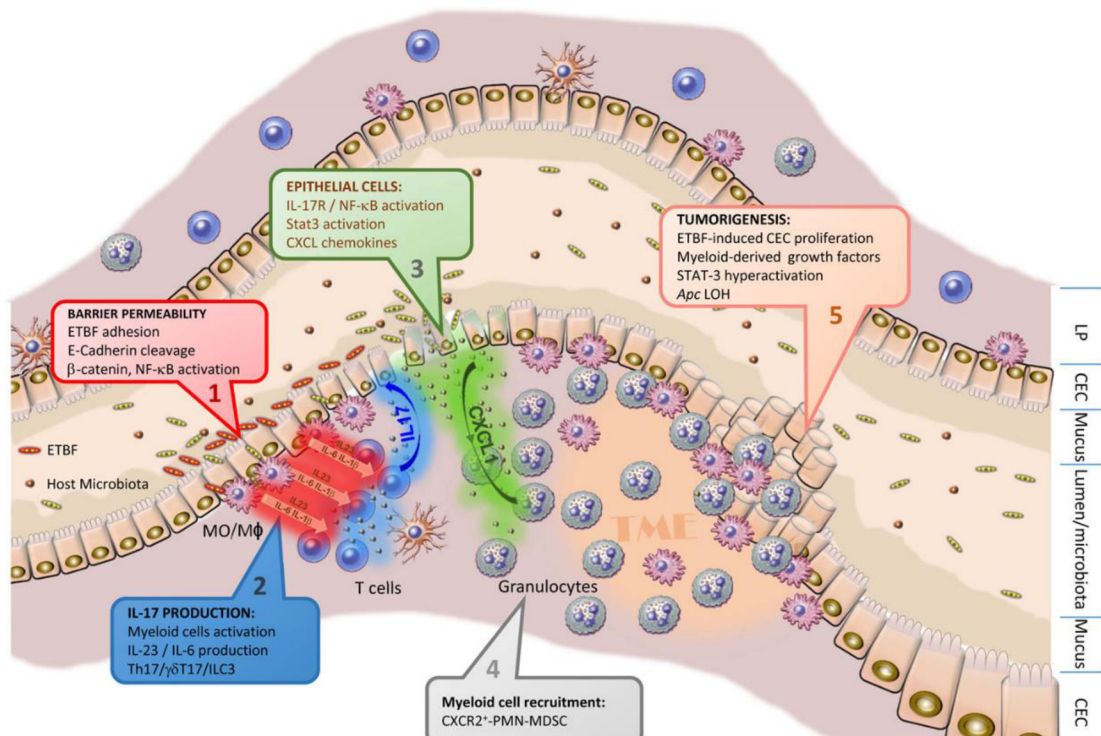
### 1.2.1.3 BFT

*Bacteroides fragilis* je striktně anaerobní bakterie, která přitahuje pozornost v souvislosti s CRC hlavně kvůli schopnosti některých kmenů produkovat enterotoxin s pro-onkogenním účinkem, BFT (Toprak et al. 2006). Bakterie druhu *B. fragilis* produkující tento toxin jsou označovány jako enterotoxigenní *B. fragilis* (ETBF).

Na molekulární úrovni je tento fragilyzin charakterizován jako tepelně labilní protein o velikosti 20 kDa, patřící do rodiny metaloproteáz (Moncrief et al. 1995, 1998). Metaloproteázy mohou kontrolovat zánětlivou aktivitu cytokinů, jsou schopné štěpit povrchové receptory, aktivovat kaspázu 3 a regulovat ostatní proteiny z metaloproteázové rodiny (Kawasaki et al. 2008). Spolu se serinovými a cysteinovými proteázami se mohou účastnit degenerativních a remodulačních procesů pojivové tkáně. Jak již bylo demonstrováno dříve, izolovaný BFT je schopen hydrolyzovat G-aktin nebo želatinu *in vitro* (Moncrief et al. 1995). Sekvence genu *bft* odhalila tři regiony se sníženou homologií nasvědčující existenci tří typů BFT: BFT-1, BFT-2 a Korea-BFT. Přestože existují tři typy BFT, aktivita všech tří izoform je založena na jejich schopnosti štěpit E-kadherin (Franco et al. 1997; Wu et al. 1998; G. T. Chung et al. 1999).

Biologická aktivita BFT byla poprvé demonstrována na modelu lidských linií epiteliálních buněk odvozených z adenokarcinomů tlustého střeva (HT29/C1). Toxicita BFT byla na buněčné kultuře reflektována ztrátou mezibuněčného spojení, otokem buňky a dalšími morfologickými změnami (Weikel et al. 1991). BFT se totiž specificky váže na membránové receptory střevních buněk, což vede k proteolytickému štěpení E-kadherinu (Wu et al. 2006, 1998). Po rozštěpení E-kadherinu je uvolněn  $\beta$ -katenin, který působí v jádře a spouští nadměrnou expresi onkoproteinu c-Myc, transkripčního faktoru nezbytného pro buněčnou proliferaci a embryogenezi buněk. Následkem je indukce trvalé buněčné proliferace (Wu et al. 2003). Indukce pro-kancerogenní kaskády reakcí byla pozorována také u myši nesoucích zárodečnou mutaci APC a spontánně vyvíjejících tumory střevní tkáň ( $APC^{Min}$ ), které byly kolonizovány ETBF. Signální dráhy zapojené do zmíněných kaskád reakcí zahrnují expresi pro-zánětlivých cytokinů jako je interleukin (IL) 17, který indukuje aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a Stat3 signálního přenašeče v epitelových buňkách distální části tlustého střeva (CEC). Konstitutivní aktivita NF- $\kappa$ B a Stat3 zde má roli spouštěče maligní transformace myeloidní řady buněk v sestupném tračníku (Obr. 4. Chung et al. 2018; Wu et al. 2009).

Obr. 4. Schéma ETBF indukované tumorigeneze (převzato z Chung et al. 2018)



- Krok 1. ETBF rozštěpí E-kadherin, což vede k uvolnění  $\beta$ -kateninu a aktivaci NF- $\kappa$ B faktoru
- Krok 2. Expres pro-zánětlivých cytokinů jako IL-17
- Krok 3. Aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a signálního přenašeče STAT3 v CEC
- Krok 4 a 5. Maligní transformace myeloidní řady buněk a tvorba adenomu

Přestože byl potvrzen pro-zánětlivý a pro-onkogenní efekt BFT, přesný mechanismus stimulace vývoje a růstu nádorů zůstává předmětem bádání. V recentní studii Allen a kol. byla popsána schopnost BFT indukovat epigenetické změny v CEC buňkách, korelující s proliferací tumorigenních buněk. Dle této studie ovlivňuje působení BFT v infikované buňce přístupnost chromatinu pro transkripci. Zpřístupnění vazebných míst pro transkripční faktory vede k upregulaci strukturních motivů transkripčních faktorů jako jsou JUND, JDP nebo FOSL1, které jsou součástí signální dráhy MAP-kinázové kaskády. Studie se následně zabývala analýzou FOSL1 motivu. Asociace tohoto motivu s nádory nesoucími mutace genu KRAS byla popsána v mnoha publikacích. Vyšší exprese FOSL1 byla zaznamenána u pacientů s rakovinou plic, slinivky a prostaty (Vallejo et al. 2017; Luo, He, and Qiu 2018; Elangovan et al. 2018). Ve studii Allen a kol. byla pozorována zvýšená exprese šesti ze sedmi genů asociovaných s FOSL1 v buňkách CEC, které byly vystaveny účinku BFT. Vzhledem k procesům modifikace DNA, které jsou spojovány s CRC, jako je tvorba jednonukleotidových polymorfismů (SNP) nebo epigenetické změny jako metylace DNA (DMR), byly tyto jevy prozkoumány také po expozici CEC buněk toxinu BFT. Ve větší míře byly pozorovány DMR úseky v mezigenové oblasti euchromatinu hypometylované DNA, což naznačuje, že strukturální změna chromatinu indukovaná působením BFT nesouvisí s hypermetylací CpG oblasti v regionech promotorů (Allen et al. 2019). Epigenetické změny v CEC buňkách se však mohou lišit oproti změnám pozorovaným v *in vivo* experimentech, kde se procesů účastní celá řada dalších faktorů jako jsou IL-17R, NF- $\kappa$ B a Stat3, které mohou finální působení BFT na buňku ovlivňovat (Chung et al. 2018). Zároveň byla prokázána vyšší produkce IL 17 u myši s vyvinutým karcinomem střeva, kolonizovaným ETBF. Bylo detekováno poškození DNA epiteliálních buněk střeva, rychlejší progresse tumoru a vyšší mortalita u myši s ETBF (Dejea et al. 2018). Poznatky z této studie korespondují s výsledky dalších dvou publikací, ve kterých je Th 17-dependentní signální dráha navržena jako významný kofaktor v procesu BFT indukované karcinogeneze (Wu et al. 2009; Chung et al. 2018).

## 1.2.2 Toxiny asociované s CRC bez indukce poškození DNA

### 1.2.2.1 CNF

Mezi další toxiny, u nichž byl popsán proonkogenní vliv, a které by mohly být v budoucnu považovány za rizikové markery CRC, patří cytotoxický nekrotizující faktor

(CNF) (Cuevas-Ramos et al. 2010; Nougayrede 2006). Cyklomodulin CNF je produkován zejména uropatogenními kmeny *E. coli*, byl detekován také u kmenů způsobujících průjem, neonatální meningitidy a bakteriémii u onkologicky nemocných pacientů (E. Oswald et al. 1991; Bouzari, Oloomi, and Oswald 2005; Hilali et al. 2000; Bisicchia et al. 1985; Alonso et al. 1987). Existují dva typy CNF, avšak pouze typ CNF1 byl detekován u humánních klinických izolátů, zatím co CNF2 byl detekován pouze u animálních kmenů *E. coli* (Hilali et al. 2000; E. Oswald et al. 1991). U buněk infikovaných kmeny produkujícími CNF1 byly pozorovány nekrotické až letální účinky, proto se kmeny *E. coli* disponující tímto toxinem označují jako nekrotoxické. *In vitro* byla popsána také schopnost alterovat cytoskelet kultivovaných buněk (Caprioli et al. 1983; De Rycke, Phan-Thanh, and Bernard 1989). U CNF1 pozitivních nekrotoxických kmenů *E. coli* byla zároveň pozorována hemolytická aktivita. Tímto faktem se zabývala studie Falbo et al. 1992, ve které byla prokázána přítomnost genů pro CNF1 a pro hemolyziny na stejném genovém klastru (Falbo, Famiglietti, and Caprioli 1992).

Toxická aktivita CNF byla demonstrována *in vitro* a *in vivo* v řadě studií (Kurnick et al. 2019; Fabian et al. 2020; Morgan et al. 2019; Buc et al. 2013). Morfologické změny infikovaných buněk jsou způsobeny permanentní aktivací p21 Rho GTPázy, která se účastní uspořádání stresových vláken z aktinu (Carla Fiorentini et al. 1997). Tento proces zahrnuje působení proteinu Cdc42, který aktivuje Rac protein následně aktivující Rho proteiny. Rho proteiny organizují stresová vlákna, zatím co Rac protein má klíčovou roli ve tvorbě lamelipodií, a Cdc42 ve tvorbě filopodií (Nobes and Hall 1995). CNF se skládá ze dvou hlavních proteinových domén. Doména s N koncem zodpovídá za transport toxinu do buňky, zatímco doména s C koncem s deamidázovou aktivitou je po endocytóze toxinu štěpena a dopravena do cytoplasmy buňky, kde je nezbytná pro biologickou aktivitu toxinu (Buetow et al. 2001; Lemichez et al. 1997; Knust et al. 2009). Všechny tři zmíněné proteiny Rho, Rac a Cdc42, jsou totiž deamidovány, což vede k inhibici hydrolázové aktivity p21 Rho GTPázy a k její permanentní aktivitě. Takto stimulovaná GTPáza indukuje polymerizaci aktinu vedoucí k tvorbě stresových vláken (Gerhard et al. 1998; Schmidt et al. 1997; May et al. 2012; Flatau et al. 1997). Zároveň aktivace těchto tří proteinů (Rho, Rac a Cdc42) vyvolává u exponovaných epiteliálních buněk makropinocytózu a pohlcení apoptických buněk, které jsou poté lysosomálně degradovány (C. Fiorentini et al. 2001). V konečném důsledku má tedy aktivace GTPázy vliv na redukci apoptózy infikovaných buněk vedoucí k jejich šíření, k tvorbě

adherujících plaků a k dalším jevům spojeným s alterací správné funkce aktinových filament (Carla Fiorentini et al. 1997, 1998; Lacerda et al. 1997).

Tyto zmíněné buněčné defekty indukované toxinem CNF mohou přispívat k maligní transformaci buňky. Pro objasnění vlivu CNF na postiženou buňku a na následný možný rozvoj CRC, byly ve studii Zhang a kol. použity lidské střevní nádorové buňky. Po vystavení buněk toxinu CNF byla pozorována zástava buněčného cyklu ve fázi cytokineze, indukovaná endoreplikace a polyploidní transformace buněk vedoucí k reverzibilnímu stárnutí. Klíčem pro přežití infikovaných buněk je zřejmě schopnost mnohjaderných buněk vstoupit do dalšího buněčného cyklu místo aby došlo k zástavě jejich proliferace. Vzniklé mnohjaderné polyploidní buňky podstupují asymetrické dělení během depolyploidizace, které dává vznik geneticky nestabilním dceřiným buňkám. Proonkogenní aktivitu CNF také podporuje fakt, že aneuploidní buňky patří u tumorů mezi nejčastěji se vyskytující jev (Zhang et al. 2018).

#### 1.2.2.2 Cif

Cyklomodulin zvaný “faktor inhibující buněčný cyklus“ (Cif) má schopnost zastavit buněčný cyklus ve fázi G2 bez přímého působení na DNA. Přestože je účinek Cif na exponovanou buňku velmi podobný aktivitě CDT, tento protein nezpůsobuje tvorbu DSBs a tudíž není považován za genotoxin. Poprvé byl tento toxin, disponující sekrečním systémem typu III (TTSS), popsán v roce 1999 u enteropatogenní *E. coli* (EPEC) a poté u enterohemoragické *E. coli* (EHEC) indukující reorganizaci cytoskeletu hostitelské buňky (Marchès et al. 2003).

Struktura Cif toxinu je tvořena třemi katalytickými doménami, které jsou nezbytné pro jeho působení na infikovanou buňku, konkrétně pro zástavu jejího buněčného cyklu, zvětšení buňky, a pro reorganizaci cytoskeletu (Hsu et al. 2008). Cif představuje efektorovou molekulu, která po své translokaci v hostitelských HeLa buňkách spouští cytopatický efekt vedoucí k zástavě buněčného cyklu při přechodu buňky z fáze G2 do M (Jean Philippe Nougayrède et al. 1999; J. P. Nougayrède et al. 2001). Buňky uvězněné v G2/M následně inhibují proces aktivace cyklin-dependentní proteinkinázy Cdk1, to způsobuje akumulaci inaktivních fosforylovaných forem Cdk1, což vede k zástavě buněčné progresu (Marchès et al. 2003). Ve studii Samba-louaka a kol. (Samba-louaka et al. 2008) byla pozorována schopnost toxinu Cif zastavit infikované buňky také v postmitotické fázi G1. Tyto buňky pak vykazovaly akumulaci proteinů p21 a p27, což

jsou inhibitory cyklin-dependentní kinázy. Akumulace těchto dvou proteinů byla zřejmě způsobena inhibicí jejich degradace v proteazomu. Nebylo však pozorováno zapojení proteinu p53 jako hlavního transkripčního aktivátoru, což nasvědčuje skutečnosti, že Cif neovlivňuje proces syntézy p21 a p27. Vzhledem k výsledné zástavě buněčného cyklu ve fázi G1/S infikované buňky lze však předpokládat, že p21 a p27 nejsou jediné proteiny ze všech molekul zahrnutých v buněčném dělení, které jsou ovlivněny aktivitou toxinu Cif (Samba-louaka et al. 2008).

Kromě účinku Cif toxinu na HeLa buňky byla jeho aktivita testována také na střevních epitelových buňkách IEC-6. Tato buněčná linie simuluje přirozené střevní prostředí při infekci EPEC kmeny. Po vystavení IEC-6 buněk Cif toxinu byla po 48 hodinách pozorována apoptóza buněk. To korespondovalo s předchozími poznatky, že ve vystavených buňkách nejprve dochází k akumulaci Cdk proteinů v důsledku zábrany jejich degradace v proteazomu, která vede v pozdní fázi k apoptóze postižených buněk (Samba-Louaka et al. 2009).

### 1.2.2.3 Kandidalyzin

Kromě bakteriálních toxinů asociovaných s CRC bychom měli vzít v potaz také první popsaný cytolytický toxin produkovaný kvasinkami druhu *Candida albicans*. Za cytotoxické působení patogenních kvasinek je zodpovědný toxin kódovaný tzv. „cell elongation 1“ (ECE1) genem, jehož zvýšená exprese byla zaznamenána u kvasinek produkujících hyfy během povrchové kandidózy. ECE1 kóduje pre-protein z 271 aminokyselin, který je štěpen enzymem Kex8p do 8 menších peptidů. Jedním z nich je peptid s označením Ece-III-93, který slouží jako aktivátor slizniční imunity a přispívá k cytolytické aktivitě *C. albicans*. U kmenů kvasinek disponujících tímto genem byla pozorována schopnost indukovat v hostitelské buňce extenzivní invazi hyf, tvorbu mikroabscesů infiltrovaných neutrofily, a poškození tkáně v místě postižení (Moyes et al. 2016).

Produkt genu ECE1, Ece-III-93, se nachází v regionu Ece1p, který je zodpovědný za indukci fosforylace MKP1 (mitogenem aktivované proteinové kinázy fosfatázy), za aktivaci protoonkogenu c-Fos, cytokinů IL-1 $\alpha$ , IL-6, a G-CSF, a za poškození epitelu. Navíc byla potvrzena klíčová úloha kandidalyzinu při cytolýze makrofágů a dendritických buněk během kvasinkové infekce. Cytolytický peptid kódovaný genem ECE1 je totiž považován za spouštěče kaskády inflamazomu NLRP3, který se běžně

exprimuje v makrofázích a který má za úkol detekovat produkty poškozených buněk. Aktivace NLRP3 je řízena mechanismem efluxu draslíkových iontů. Kandidalyzin poté indukuje prostřednictvím NLRP3 vyplavení interleukinu IL-1 $\beta$  lidskými makrofágy. Poškození hostitelské tkáně se však odehrává také nezávisle na inflamazomové odpovědi. Nedochozí tedy k pyroptóze, která je charakterizována jako následek působení sekretovaných kaspáza1-dependentních IL-1 $\beta$ , ale k cytolýze makrofágů (Kasper et al. 2018).

Vzhledem k prokázané schopnosti kandidalyzinu vyvolat silnou zánětlivou odpověď v infikovaných buňkách a vzhledem k predispozici rozvoje CRC u pacientů s ISZ, bychom měli tento toxin vzít v potaz při výběru faktorů potenciálně užitečných jako markery CRC. Bohužel se v současné době studie zaměřují hlavně na genotoxiny produkované enterobakteriemi, zejména na kolibaktin. Kandidalyzinu by však neměla být odepřena pozornost, data o expresi tohoto toxinu u kvasinek izolovaných od CRC pacientů by mohla přinést další poznatky o jeho možné asociaci s CRC. V recentní studii Satiman a kol. je popsána možnost zapojení kandidalyzinu při vývoji maligních nádorů v dutině ústní (Nasrullah Satiman et al. 2020).

### 1.2.3 Ostatní bakteriální markery asociované s CRC

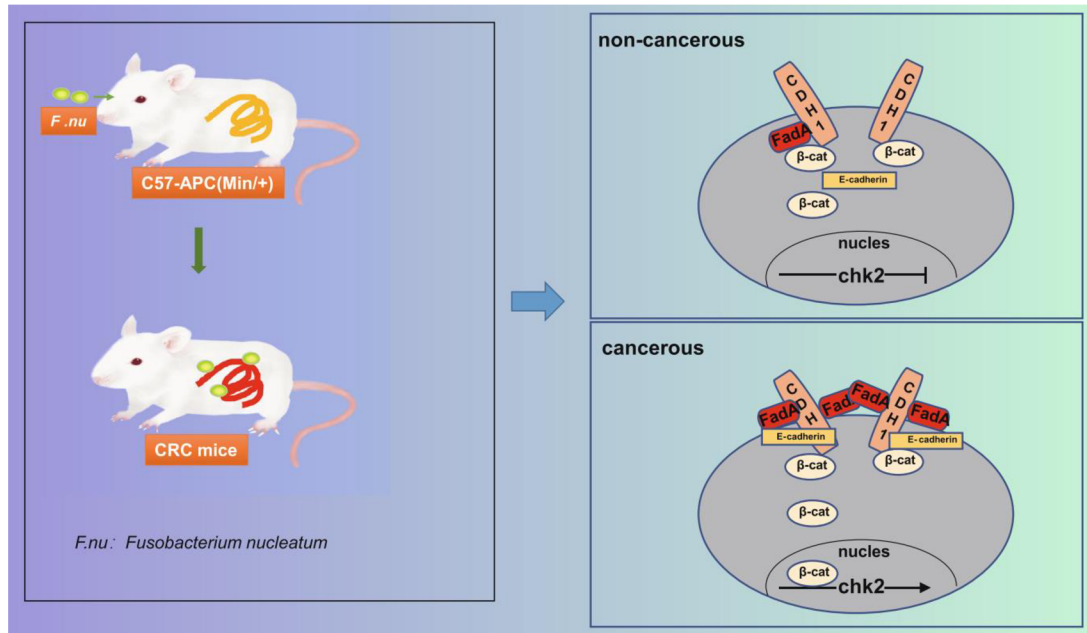
#### 1.2.3.1 *Fusobacterium nucleatum*

Bakterie druhu *F. nucleatum* je spojována se zánětlivým onemocněním střev i s CRC. Výskyt této bakterie ve střevním mikrobiotě osob se střevním zánětem je signifikantně vyšší než ve střevech lidí bez střevního onemocnění (Tunsjø et al. 2019). Bylo prokázáno, že *F. nucleatum* akceleruje CRC v preklinických modelech *in vitro*, ale také *in vivo* (Kostic et al. 2013; Rubinstein et al. 2013). *F. nucleatum* má schopnost inhibovat imunitní odpověď proti tumorům prostřednictvím Fap2 proteinu, který přímo interaguje s jedním z tlumivých receptorů T lymfocytů, TIGIT. Navázání na TIGIT receptory vede k inhibici cytotoxicity NK buněk (Gur et al. 2015). Další studie popsala schopnost proteinu Fap2 fusobakterií rozeznat epiteliální polysacharid Gal-GalNac, který je zvýšeně exprimován tumory střev. Rozeznání tohoto hostitelského polysacharidu umožňující následné uchycení fusobakterií na tumor by vysvětlovalo zvýšenou četnost tohoto druhu bakterií ve střevech pacientů s CRC (Abed et al. 2016).

Zároveň bylo nedávno prokázáno, že *Fusobacterium nucleatum* indukuje poškození DNA a narušení buněčného cyklu ve tkáni karcinomu střeva prostřednictvím

mechanismu FadA-dependentní aktivace E-kadherin/ $\beta$ -kateninové kaskády vedoucí ke zvýšené expresi *chk2* (Obr. 5, Guo et al. 2020). *Chk2* je serin-threoninová kináza podílející se na opravě DNA při jejím poškození (Magni et al. 2014). Nadprodukce *chk2* vede k rozsáhlému poškození DNA buněk u CRC *in vivo*. Potvrzena byla také účast proteinu *chk2* na progresi CRC (Takemura et al. 2006; Oka et al. 2010).

Obr. 5. FadA-dependentní poškození DNA prostřednictvím zvýšené exprese *chk2* vedoucí k tumorigenezi (převzato z Guo et al. 2020)



U *F. nucleatum* byla demonstrována schopnost produkovat extracelulární vezikuly s membránovými poriny FomA, které mohou spustit odpověď slizničního imunitního systému střeva dynamín-zprostředkovanou endocytózou vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B. Právě povrchový protein FomA je zřejmě zodpovědný za aktivaci NF- $\kappa$ B, která je TLR2-dependentní. Tyto dva proteiny, TLR2 a FomA, jsou proto považovány za hlavní stimulatory střevní slizniční imunity při infekci *F. nucleatum* (Martin-Gallausiaux et al. 2020). Všechny pro-zánětlivé procesy ve střevě mohou usnadnit vznik a rozvoj CRC, proto by se o *F. nucleatum* mělo uvažovat jako o „driver“ bakterii v souvislosti s CRC.

### 1.3 Metody screeningu CRC

Šance na dobrou prognózu CRC roste při včasné diagnóze tohoto onemocnění. Hlavní screeningovou metodou CRC je kolonoskopie. Jedná se o velice citlivou, avšak zároveň nekomfortní metodu, a proto je snahou vyvinout citlivé a specifické neinvazivní



screeningové metody. Standardně je používán test okultního krvácení ze stolice (FOBT), který je rychlý a technicky jednoduchý. Jeho citlivost a specifita byla významně zvýšena využitím imunochemické reakce (FIT), takže je schopen detekovat mezi 71 a 80 % případů CRC, při specifitě až 94 % (Hirai et al. 2016). Falešná pozitivita je dána především výskytem jiných onemocnění, způsobujících zvýšenou přítomnost krve ve stolici (typicky hemeroidy). I přes svou vysokou sensitivitu tohoto testu mu však stále uniká 20-30 % případů CRC, které neuvolňují do střevního obsahu významné množství krve. Test navíc vyžaduje samoodběr stolice po defekaci, což snižuje ochotu populace k jeho používání. Pro včasný záchyt CRC by navíc měl být opakován 1× ročně, zatímco u primární screeningové kolonoskopie s negativním výsledkem u osoby z obecné populace bez specifického rizika CRC postačuje opakování nejdříve po 5 letech, při opakovaném negativním výsledku se tento interval dále prodlužuje. Proto trvá snaha o zvýšení zejména citlivosti neinvazivního screeningu CRC vývojem dalších metod.

U onkologických pacientů je v krevním séru pozorována abnormální exprese molekul microRNA (miRNA). Tento fakt využívá metoda detekce šesti specifických miRNA molekul sloužících jako CRC markery. Z podstaty použitého typu vzorku (sérum) se jedná o minimálně invazivní metodu, proveditelnou nezávisle na defekaci a bez nutnosti přímého zapojení pacienta; pro rutinní využití však musí být vyzkoušena na větším počtu pacientů (J. Wang et al. 2014). Další vývoj přinesl řadu kandidátních molekul miRNA, které by mohly sloužit nejen jako markery CRC, ale pomáhat i při neinvazivním stanovení charakteru a míry progresu tumoru (Di et al. 2020). Další recentní studie Wang a kol navrhuje FOBT kombinovaný s detekcí metylované DNA ve stolici (sDNA-FOBT). Přestože tato metoda vykazuje vyšší citlivost pro záchyt časných forem CRC a prekanceróz než běžně prováděný test FOBT, citlivost detekce raného stádia CRC pomocí sDNA-FOBT zatím nedosahuje statistické signifikace (D. Y. Wang et al. 2021).

V naší práci jsme se zaměřili na potenciální markery CRC představované bakteriálními druhy nebo toxiny, asociovanými s CRC, které by bylo vhodné validovat jako markery pro screening CRC. Důležitým argumentem podporujícím tento směr výzkumu je také ekonomická dostupnost a široká aplikovatelnost technik založených na detekci bakteriálních druhů a toxinů. Bakteriální kultivace z klinických vzorků, identifikace získaných izolátů pomocí „matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“ (MALDI-TOF) hmotnostní spektrometrie (MS), porovnání kulturomu zdravých jedinců s CRC pacienty a následná PCR detekce genů kódujících toxiny u

vybraných bakterií by mohla představovat dostupnou a snadno proveditelnou screeningovou metodu.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené disertační práce bylo:

- Průběžně zpracovávat výtěry z rektu od pacientů s CRC a od zdravých kontrol.
- Z primokultivací subkultivovat všechny morfologicky odlišné kolonie a identifikovat všechny získané izoláty pomocí MALDI-TOF MS.
- Identifikované bakteriální druhy podrobit statistické analýze a posoudit jejich prevalenci u CRC pacientů ve srovnání s kontrolami bez CRC.
- Uchovávat průběžně pro další analýzy při -80 °C izoláty bakteriálních druhů, které jsou dle literatury pozitivně asociovány s CRC.
- Otestovat bakteriální izoláty, které by mohly nést geny kódující toxiny s pro-onkogenním potenciálem.
- Zhodnotit potenciál jednotlivých metod pro neinvazivní screening CRC u pacientů starších 50 let.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Pacienti a klinický materiál

Pro naši studii byly vzorky odebírány metodou výtěru z rekta od pacientů s nově diagnostikovaným CRC. Kromě pacientů s CRC byla v rámci probíhající studie oslovena také kontrolní skupina pacientů za účelem porovnání střevní mikrobioty. Pro odběr byly použity odběrové soupravy, sestávající ze sterilních vatových tamponů s transportním médiem Amies (COPAN Diagnostics Inc.-Transystem™ 116C). Odběr vzorků probíhal na chirurgické ambulanci FN Olomouc v letech 2015 - 2019. Po celou dobu této pětileté studie byly vzorky od všech pacientů průběžně zpracovávány za účelem izolace maximálního počtu druhů bakterií, kvasinek a vláknitých hub, ze kterých byly následně vybírání adepti na testování toxinů. Pro nejvyšší výskyt toxinů v souvislosti s CRC dle dosavadních publikací a zároveň pro kultivační nenáročnost byly vybrány bakterie druhu *E. coli* jako hlavní testovací soubor izolátů.

#### 3.2 Zpracování vzorků

Odebrané vzorky na vatovém tamponu byly nejprve resuspendovány ve 200 µl nutričně bohatého média Brain Heart Infusion Broth (Infuze mozkové a srdeční tkáně, BHI) s přídavkem 10% séra (Oxoid s.r.o., Česká republika). Poté byly takto připravené vzorky podrobeny bakteriologické kultivaci na selektivních a selektivně diagnostických půdách viz Tabulka 3.

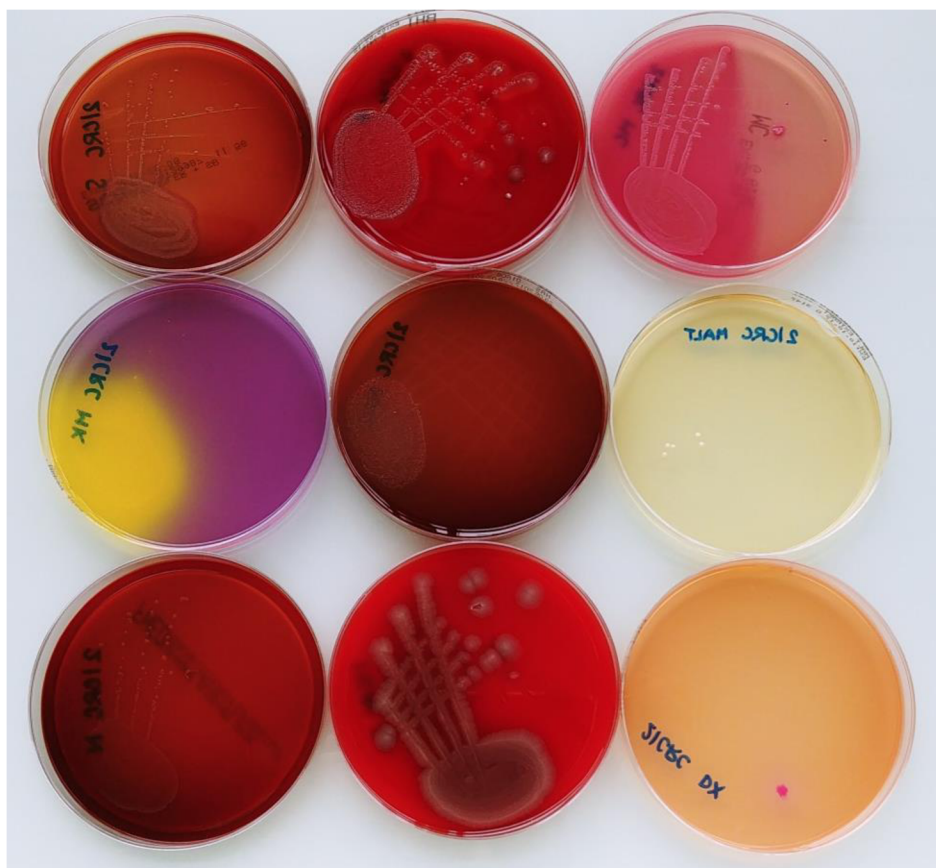
Tabulka 3. Kultivační půdy

Název kultivačního média	Skupiny bakterií, pro které je médium určeno	Vztah ke kyslíku	Teplota kultivace (°C)
Columbia krevní agar (Trios s.r.o., Česká republika)	Aerobní druhy G+ i G- bakterií	aerobní	37
MacConkey agar (Trios s.r.o., Česká republika)	<i>Enterobacteriaceae</i>		
Deoxycholát citrátový agar (Trios s.r.o., Česká republika)	<i>Enterobacteriaceae</i>	aerobní	30
Sabouraudův agar (Trios s.r.o., Česká republika)	Kvasinky Vláknité houby		
NAS agar (Oxoid s.r.o., Česká republika)	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>	Mikroaerofilní (bez katalyzátoru, vakuování 75 %, plynování 55 %, složení: 80 % N <sub>2</sub> , 10 % H <sub>2</sub> , 10 % CO <sub>2</sub> )	37
McKay agar (Oxoid s.r.o., Česká republika – vyrobena na zakázku)	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>		

Název kultivačního média	Skupiny bakterií, pro které je médium určeno	Vztah ke kyslíku	Teplota kultivace (°C)
Anaerobní krevní agar (Trios s.r.o., Česká republika)	Anaerobní druhy G+ i G- bakterií	Anaerobní (s katalyzátorem, vakuování 99,5 %, plynování 70,5 %, složení: 80 % N <sub>2</sub> , 10 % H <sub>2</sub> , 10 % CO <sub>2</sub> )	37
Schaedlerův anaerobní agar s ovčí krví, haeminem a vitamínem K1 (Oxoid s.r.o., Česká republika)	Aerobní i anaerobní druhy, inhibice <i>E. coli</i>		
Fastidious anaerobní agar s Neomycinem (Oxoid s.r.o., Česká republika)	<i>Bacteroides</i> <i>Eubacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Veillonella</i>		

Bylo použito celkem 9 typů kultivačních půd pro pokrytí co nejširšího spektra bakteriálních druhů ze střevní mikrobioty (Obr. 6). Naočkované plotny byly v aerobní atmosféře inkubovány minimálně dva dny, v anaerobní atmosféře byla kultivace prodloužena na minimálně 3 až 5 dnů. Pro přípravu anaerobního prostředí byl použit Látalův Anaerobní systém (LAS; Trios s.r.o., Česká republika).

Obr. 6. Nárůst na všech typech kultivačních půd.



1. řada: Schaedlerův anaerobní agar, Anaerobní krevní agar, MacConkey agar
2. řada: McKay agar, NAS agar, Sabouraudův agar
3. řada: Fastidious anaerobní agar s Neomycinem, Columbia krevní agar, Deoxycholát-citrátový agar

Byla provedena subkultivace každé morfologicky odlišné kolonie na každé plotně. Aerobní bakterie byly subkultivovány na Columbia krevním agaru, mikroaerofilní a anaerobní bakterie na anaerobním krevním agaru (Obr. 7). Čisté kultury byly následně identifikovány pomocí MALDI-TOF MS s využitím přístroje Microflex LT/SH a software Biotyper (Bruker s.r.o., Německo) za použití matrice HCCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich) po hrubé extrakci proteinů působením kapky 70% kyseliny mravenčí. Celkem bylo identifikováno 158 bakteriálních druhů, u dvou rodů (*Enterobacter sp.* a *Porphyromonas sp.*) bylo upuštěno od snahy o přesnou druhovou identifikaci, která je při použití MALDI-TOF MS nespolehlivá. Potenciálně toxigenní bakteriální druhy byly zamrazeny za použití soupravy ITEST kryobanky B (ITEST plus s.r.o., Česká republika) a uchovávány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U všech izolátů druhu *E. coli* byla zaznamenávána hemolytická aktivita na Columbia krevním agaru.

Obr. 7. Bakteriální kultury subkultivované na anaerobním krevním agaru.



### 3.3 Genetická analýza izolátů

#### 3.3.1 Extrakce DNA

##### 3.3.1.1 Hrubá extrakce DNA tepelnou lýzou

Ze všech bakteriálních druhů *E. coli* byl připraven hrubý extrakt DNA pomocí tepelné lýzy. DNA byla extrahována vždy z čisté bakteriální kultury na Columbia krevním agaru. Nejprve byla resuspendována 1 bakteriální kolonie v  $50\text{ }\mu\text{l}$  destilované vody v  $1,5\text{ ml}$  mikrozkuhavce typu Eppendorf. Takto připravená bakteriální suspenze byla inkubována

10 minut při 90 °C v tepelném bloku. Lyzát byl následně centrifugován po dobu 2 minut při 13 000 g. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a skladován při -20 °C.

### 3.3.1.2 Izolace DNA pomocí DNeasy Blood and Tissue kitu

Z bakteriálních druhů *B. fragilis* byla izolována DNA pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Německo) dle instrukcí výrobce s mírnými úpravami. Pomocí 1 µl bakteriologické kličky byla sklizena bakteriální kultura z anaerobního krevního agaru a resuspendována v 1 ml sterilní destilované vody a následně centrifugována (10 minut, 5 000 g). Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 180 µl pufru ATL a 20 µl proteinázy K (20 mg/ml). Suspenze byla promíchána vortexem a inkubována 1 hodinu při 56 °C. Poté byla suspenze opět vortexována a bylo přidáno 200 µl pufru AL. Tato suspenze byla opět promíchána vortexováním a bylo přidáno 200 µl 96 % ethanolu. Následovalo další vortexování a přenesení 700 µl této směsi na kolonku v záchytné 2 ml zkumavce. Tyto 2 ml zkumavky s kolonkami byly centrifugovány po dobu 1 minuty při 6000 g. Záchytná kolonka byla přemístěna do nové 2 ml záchytné zkumavky. Ke směsi bylo přidáno 500 µl promývacího pufru AW1 a následovala další centrifugace (1 min 6000 g). Kolonka byla opět přemístěna do nové záchytné 2 ml zkumavky a bylo přidáno dalších 500 µl promývacího pufru AW2. Následovala centrifugace po dobu 3 minut při 13 000 g. Kolonka byla nakonec přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf a na záchytnou kolonku bylo přidáno 200 µl elučního pufru AE. Následovala inkubace po dobu 1 minuty při 37 °C a poté centrifugace po dobu 1 minuty při 6 000 g. Získaný supernatant byl uchován při -20 °C.

### 3.3.1.3 Izolace DNA kvasinek pomocí kitu YeaStar Genomic DNA Kit

Z kvasinek *Candida albicans* byla izolována DNA pomocí kitu YeaStar Genomic DNA Kit (Zymo Research, USA) dle instrukcí výrobce s mírnými úpravami. Pro izolaci byl aplikován protokol II, který je určen pro izolaci DNA bez použití chloroformu.

Z čistých 24-hodinových kultur kvasinek na Sabouraudově agaru byla odebrána kultura bakteriologickou kličkou do 1 ml sterilní destilované vody. Po dosáhnutí optické hustoty  $OD_{660} = 1$  byla suspenze centrifugována (2 minuty, 1 000 g) a následně byl odlit supernatant. K peletu bylo přidáno 120 µl pufru YD a 5 µl R-Zymolázy. Pelet byl resuspendován vortexováním a inkubován 1 hodinu při 37 °C. Poté bylo do směsi přidáno 120 µl lyzačního pufru. Směs byla jemně promíchána vortexováním. Následovala

centrifugace 2 minuty při 12 000 g. Supernatant byl přenesen do záchytné kolonky v čisté 1,5 ml mikrozkuhavce. Následovala centrifugace po dobu 1 minuty při 12 000 g. Poté bylo přidáno 300 µl promývacího pufru a tato směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 12 000 g, tento krok byl opakován. Záchytná kolonka byla přenesena do čisté mikrozkuhavky a na kolonku bylo přidáno 60 µl sterilní destilované vody a následovala inkubace směsi po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Na závěr byla směs centrifugována 1 minutu při 12 000 g.

### 3.3.2 Genetická analýza izolátů *Escherichia coli*

#### 3.3.2.1 Detekce genů kódující toxiny u *E. coli*

Pro detekci genů kódující toxiny byla použita PCR amplifikace za použití qPCR 2× SYTO-9 Master Mix, který je vhodný pro následnou analýzu křivek tání DNA produktů (Top-Bio, Česká republika). PCR reakční směs o objemu 20 µl byla složena z 1× qPCR SYTO-9 Master Mixu, primerů o výsledné koncentraci 0,1 µM a 1 µl templátové DNA. Nejprve byla testována přítomnost dvou genů kódující toxin kolibaktin; *clbB* – marker 5'-konce ostrovu pks a *clbN* – marker 3'-konce ostrovu pks. U všech izolátů byla provedena další PCR reakce pro detekci genů *cnf1* a *cdtB*.

Primery použité pro detekci genů kódující zmíněné toxiny jsou uvedeny v Tabulce 4. Pro PCR genů kódující toxin kolibaktin bylo použito následující schéma PCR amplifikace: preinkubace 95 °C 300 s, tří-kroková amplifikace opakující se ve třiceti cyklech 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 60 s; závěrečná extenze 72 °C 600 s (upraveno dle Johnson et al. 2008). Při detekci genů pro toxin CNF byl použit program: preinkubace 95 °C 30 s, následovala dvou-kroková amplifikace v pěti opakování 95 °C 30 s, se snižujícím se teplotním gradientem o 1 °C ze 72 °C na 63 °C. Poté byla provedena tří-kroková amplifikace ve dvaceti opakování: 95 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 30s; závěrečná extenze 72 °C 300 s (upraveno dle Pass, Odedra, and Batt 2000). Pro detekci genu *cdtB* byl použit program: preinkubace 95 °C 300s, tří-kroková amplifikace ve čtyřiceti opakování 94 °C 60 s, 56 °C 60 s, 72 °C 60 s; závěrečná extenze 72 °C 600 s (upraveno dle Toth et al. 2003).



Tabulka 4. Primery použité pro detekci toxinů.

Cílový gen	Název primeru	sekvence primeru (5' → 3')	<sup>1</sup> D (bp)	<sup>2</sup> T <sub>a</sub> (°C)	reference	
<i>clbB</i>	F	GAT TTG GAT ACT GGC GAT AAC CG	579	57	(J. R. Johnson et al. 2008)	
	R	CCA TTT CCC GTT TGA GCA CAC				
<i>clbN</i>	F	GTT TTG CTC GCC AGA TAG TCA TTC	552	63		(Pass, Odedra, and Batt 2000)
	R	CAG TTC GGG TAT GTG TGG AAG G				
<i>cdtB</i>	CDTs1 - F	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	466	56	(Tóth et al. 2003)	
	CDTas1 - R	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA				
	CDTs2 - F	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG				
	CDTas2 - R	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA				

<sup>1</sup>D- velikost amplifikovaného úseku

<sup>2</sup>T<sub>a</sub> – teplota nasedání primerů

Pro detekci vzniklých produktů byla použita analýza tání s vysokým rozlišením (HRMA) s následujícím schématem: 95 °C 60 s, 40 °C 60 s, 65 °C 1 s s přechodem 2,2 °C/s, 92 °C 1 s. Po optimalizaci PCR reakcí byla takto nastavená analýza tání pro detekci produktů PCR použita u všech provedených PCR.

Dále byla pomocí triplexní PCR provedena biotypizace izolátů pro určení fylogenetické skupiny dle publikace Clermont, Bonacorsi, and Bingen 2000. Schéma PCR reakce bylo upraveno dle Clermont a kol: preinkubace 95 °C 300 s, tří-kroková amplifikace opakující se ve třiceti cyklech 94 °C 30 s, 60 °C 90 s, 72 °C 60 s; závěrečná extenze 72 °C 600 s. Primery pro biotypizaci izolátů jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Primery použité pro určení fyloskupin izolátů *E. coli*

Cílový gen	Název primeru	sekvence primeru (5' → 3')	<sup>1</sup> D (bp)	<sup>2</sup> T <sub>a</sub> (°C)
<i>chuA</i>	chuA.1F	GACGAACCA ACGGTCAGGAT	279	60
	chuA.2R	TGCCGCCAGTACC AAAGACA		
<i>yjaA</i>	yjaA.1F	TGAAGTGTCAGGAGACGCT G	211	
	yjaA.2R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4.C2	TspE4C2.1F	GAGTAATGTCCGGGGCATTCA	152	
	TspE4C2.2R	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

<sup>1</sup>D - velikost amplifikovaného úseku

<sup>2</sup>T<sub>a</sub> – teplota nasedání primerů

Pro zhodnocení statistické významnosti výskytu genů kódujících toxiny a schopnosti daných izolátů hemolyzovat byl použit test chí-kvadrát za pomoci online kalkulátoru doporučeného statistikem (<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>).

### 3.3.2.2 Gelová elektroforéza

Při optimalizaci PCR reakcí a pro ověření jejich specifity byla použita gelová elektroforéza. Byl použit 1,5 % agarózový gel se 4  $\mu$ l barviva SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, Velká Británie). Do jamek gelu bylo přeneseno 10  $\mu$ l vzorku smíchaného s 2  $\mu$ l nanášecího pufru (DNA loading dye, Thermo Scientific, Velká Británie). Separace probíhala po přelití gelu 1 $\times$  TBE pufrem (Biotech, Česká republika) při napětí 5 V/cm po dobu 30 až 50 minut. PCR produkty byly vizualizovány pomocí fotodokumentačního systému Azure 200 (Azure Biosystems, USA). Velikost produktů byla stanovena pomocí DNA markeru o rozsahu 200 – 1500 bp (Top-Bio, Česká republika).

### 3.3.2.3 Klonální analýza kolibaktin-pozitivních *E. coli* pomocí RAPD PCR

Pomocí RAPD PCR byla provedena klonální analýza 43 kolibaktin-pozitivních kmenů *E. coli* a 1 izolátu *E. coli*, u kterého nebyl gen *clb* detekován. Pro RAPD analýzu byl použit primer 1247 (5'-AAGAGCCCGT) (Madico, Akopyants, and Berg 1995). PCR reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l obsahovala 1 $\times$  qPCR SYTO-9 Master Mix, 1  $\mu$ l templátové DNA, primer 1247 o výsledné koncentraci 2,5  $\mu$ M a MgCl<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 2,5 mM. PCR reakce byla provedena za podmínek: preinkubace 94 °C 300 s, následovala odstupňovaná amplifikace ve 40 opakováních s preinkubací 45 °C 60 s, se snižujícím se teplotním gradientem o 2,2 °C/s z 94 °C na 38 °C 60 s a se zvyšujícím se teplotním gradientem o 4,4 °C/s na 72 °C 120 s. Poté byla provedena závěrečná extenze při 72 °C 600 s. Pro separaci amplifikovaných DNA sekvencí byla použita gelová elektroforéza viz kapitola 3.3.2.2 s tím rozdílem, že byl použit 2 % agarózový gel a separace probíhala při napětí 5 V/cm po dobu 3 hodin. Gelová elektroforéza s takto nastavenými parametry byla použita pro vizualizaci produktů pro všechny RAPD profily.

### 3.3.3 Genetická analýza izolátů *Bacteroides fragilis*

#### 3.3.3.1 Detekce genů kódujících *B. fragilis* toxin

Pro detekci genu kódujícího toxin *B. fragilis* byla opět použita PCR za použití qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, Česká Republika). Nejprve byla u všech izolátů testována přítomnost genu *bft*. Pokud byl tento gen detekován, byla provedena další PCR, která už detekovala gen kódující konkrétní typ toxinu (*bft1*, *bft2* a *bft3*). Primery použité pro detekci genů kódující zmíněné toxiny jsou uvedeny v Tabulce 6 dle publikace Odamaki et al. 2006. Výsledná koncentrace u jednotlivých primerů byla 0,5  $\mu$ M, zbylé složení reakční směsi odpovídalo PCR směsi popsané v kapitole 3.3.2.1. Pro amplifikaci genů kódující toxin *B. fragilis* bylo použito schéma PCR reakce: preinkubace 94 °C 10 s, tří-kroková amplifikace opakující se ve čtyřiceti cyklech 94 °C 5 s, 60/66 °C 30 s, 72 °C 30 s; závěrečná extenze 72 °C 180 s (upraveno dle Odamaki et al. 2012). Pro separaci amplifikovaných produktů byla použita gelová elektroforéza viz kapitola 3.3.2.2.

Tabulka 6. Primery použité pro detekci genů toxinu *B. fragilis*

Cílový gen	Název primeru	sekvence primeru (5' → 3')	<sup>1</sup> D (bp)	<sup>2</sup> T <sub>a</sub> (°C)
<i>bft</i>	F	GGATACATCAGCTGGGTTGTAG	296	66
	R	GCGAACTCGGTTTATGCAGT		
<i>bft1</i>	F	TCTTTTGAATTATCCGTATGCTC	169	
	R	CTTGGGATAATAAAATCTTAGGGATG		
<i>bft2</i>	F	ATTTTATAGCGATTCTATACATGTTCTC	114	60
	R	GGGCATATATTGGGTGCTAGG		
<i>bft3</i>	F	TGGATCATCCGCATGGTTA	148	
	R	TTTGGGCATATCTTGGCTCA		

<sup>1</sup>D - velikost amplifikovaného úseku

<sup>2</sup>T<sub>a</sub> – teplota nasedání primerů

#### 3.3.3.2 Klonální analýza enterotoxigenních *B. fragilis* pomocí RAPD PCR

Pro klonální analýzu 28 izolátů *B. fragilis* byla aplikována metoda RAPD PCR za použití primeru 272; 5'-AGC GGG CCA A (Mahenthalingam et al. 1996). PCR reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l obsahovala 1 $\times$  qPCR SYTO-9 Master Mix, primer 272 o výsledné koncentraci 2,5  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 2,5 mM a 1  $\mu$ l templátové DNA. Pro amplifikaci bylo použito schéma PCR reakce: preinkubace 94 °C 300 s, sedmi-

kroková amplifikace opakující se ve třiceti cyklech: 94 °C 10 s, 45 °C 10 s, 50 °C 2 s, 55 °C 2 s, 60 °C 2 s, 65 °C 2 s, 72 °C 10 s; závěrečná extenze 72 °C 180 s.

### 3.3.4 Genetická analýza izolátů *Candida albicans*

#### 3.3.4.1 Detekce genu kódujícího kandidalysin u izolátů *C. albicans*

U všech 20 dostupných izolátů *C. albicans* byla provedena PCR reakce detekující gen *ece1* kódující prekurzor toxického proteinu kandidalysinu. Amplifikace genu byla provedena za použití primerů dle Al-zubaidi et al. 2019; forward primer 5'-CCA TCA TCC ACC ATG CTC CA, reverse primer 5'-TCT GAC GAC GGC ATT AGC AA. Výsledná koncentrace primerů byla 0,5 µM, zbylé složení reakční směsi odpovídalo PCR směsi popsané v kapitole 3.3.2.1. Pro amplifikaci genu *ece1* bylo použito následující schéma PCR reakce: preinkubace 95 °C 300 s, tří-kroková amplifikace opakující se ve čtyřiceti cyklech 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, závěrečná extenze 72 °C 300 s (upraveno dle Al-Zubaidi 2019). Pro separaci PCR produktů byla použita gelová elektroforéza viz kapitola 3.3.2.2.

#### 3.3.4.2 Klonální analýza izolátů *C. albicans* pomocí RAPD PCR

Pro klonální analýzu 20 izolátů *C. albicans* byla opět použita metoda RAPD PCR. Pro tento účel byl použit primer (5'-ACG GGC CAG T) dle (Liu et al. 1996). PCR reakční směs se skládala z 1× qPCR SYTO-9 Master Mixu, primeru o výsledné koncentraci 1 µM, MgCl<sub>2</sub> o výsledné koncentraci 2 mM a 1 µl templátové DNA. Pro RAPD PCR reakci bylo použito schéma: preinkubace 95 °C 300 s, tří-kroková amplifikace opakující se v padesáti cyklech 95 °C 5 s, 48 °C 10 s, 72 °C 40 s závěrečná extenze 72 °C 300 s.

### 3.3.5 Vyhodnocení klonální analýzy izolátů pomocí softwaru Gel Compare

RAPD profily byly porovnány pomocí softwaru GelCompare II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Dendrogramy byly získány za použití UPGMA algoritmu a Diceho koeficientu podobnosti, tolerance byla nastavena na 1 %.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Kultivační detekce

Celkem bylo vykultivováno a následně pomocí MALDI-TOF MS identifikováno 158 bakteriálních druhů získaných ze vzorků od 290 pacientů (148 CRC, 142 kontrol). Souhrnná tabulka výsledků viz Příloha č. 1. Průměrně bylo vykultivováno 9,2 bakteriálních druhů na pacienta u kontrol a 9,3 bakteriálních druhů na pacienta u CRC. Pro test statistické významnosti výskytu konkrétního druhu v závislosti na diagnóze byly vybrány bakteriální druhy, které se vyskytovaly alespoň u 5 pacientů v každé kategorii (podmínka použití chí-kvadrát testu) a vykazovaly alespoň 1,5-násobný rozdíl ve výskytu mezi CRC a kontrolami. Z tohoto souboru dosahovalo  $p < 0,3$  celkem 14 druhů, zbývajících 144 druhů tyto podmínky nesplnilo. Výsledky shrnuje Tabulka 7 a 8.

Tabulka 7. Vybrané bakteriální druhy, které se ve zvýšené míře vyskytovaly u CRC pacientů (způsob výběru viz text)

	148 CRC	142 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
<i>Clostridium ramosum</i>	25	8	0,0025	16,9	5,6
<i>Clostridium perfringens</i>	23	8	0,0063	15,5	5,6
<i>Bacteroides fragilis</i>	22	10	0,0336	14,9	7
<i>Enterococcus faecium</i>	33	20	0,0704	22,3	14,1
<i>Candida albicans</i>	24	13	0,0716	16,2	9,2
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	37	24	0,0907	25	16,9
<i>Collinsella aerofaciens</i>	24	15	0,1452	16,2	10,6
<i>Streptococcus constellatus</i>	12	6	0,1707	8,1	4,2

Signifikance byla potvrzena u tří bakteriálních druhů ve vazbě na CRC diagnózu: *C. ramosum*, *C. perfringens* a *B. fragilis*.

Dále byla vypočítána signifikance u bakteriálních druhů, které se naopak vyskytovaly ve vyšším počtu u kontrol než u CRC pacientů (Tabulka 8).

Tabulka 8. Vybrané bakteriální druhy, které se ve zvýšené míře vyskytovaly u kontrol (způsob výběru viz text)

	148 CRC	142 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	24	0,0383	8,8	16,9
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	12	0,066	3,4	8,5
<i>Lactobacillus gasseri</i>	5	12	0,066	3,4	8,5
<i>Streptococcus salivarius</i>	11	18	0,1368	7,4	12,7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7	12	0,200	4,7	8,5
<i>Prevotella disiens</i>	5	9	0,240	3,4	6,3

Vzhledem k tomu, že se screeningové vyšetření pro CRC provádí z důvodů obecného populačního rizika jen u osob starších 50 let, ověřili jsme další statistickou analýzou, zda pozorované asociace bakteriálních druhů s CRC nebo stavem bez CRC platí i u této věkové skupiny. Soubor 50+ tvořilo 263 pacientů, z toho 140 pacientů s diagnostikovaným CRC (Tabulka 9) a 123 pacientů s jinou diagnózou, než je CRC (Tabulka 10).

Tabulka 9. Diagnózy CRC pacientů starších 50 let

<b>Diagnóza</b>	<b>Počet pacientů</b>
ZN-konečník	43
ZN-esovitý tračník	22
ZN-rektosigmoideální spojení	19
ZN-vzestupný tračník	15
ZN-slepé střevo	13
ZN-slezinné ohbí	8
ZN-jaterní ohbí	5
ZN-sestupný tračník	6
ZN-příčný tračník	1
ZN-červovitý přívěsek	1
Adenom rekta	5
Karcinom rekta	1
ZN-tlusté střevo NS	1
<b>Celkem</b>	<b>140</b>

ZN = zhoubný novotvar

Tabulka 10. Diagnózy kontrol starších 50 let

Diagnóza	Počet pacientů
Kýla	52
Kámen žlučníku	37
Hemeroidy	12
Malignita mimo tlusté střevo	14
Jiné	8
<b>Celkem</b>	<b>123</b>

Pro tento soubor 263 pacientů bylo pro statistické zhodnocení podle stejných kritérií jako pro základní soubor vybráno celkem 14 bakteriálních druhů (Tabulka 11 a 13). Zvýšený výskyt bakteriálních druhů u CRC pacientů shrnuje Tabulka 11.

Tabulka 11. Vybrané bakteriální druhy se zvýšeným výskytem u CRC pacientů starších 50 let (způsob výběru viz text)

	140 CRC	123 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
<i>Clostridium ramosum</i>	24	5	0,0007	17,1	4,1
<i>Clostridium perfringens</i>	22	8	0,0191	15,7	6,5
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	35	19	0,0557	25,0	15,5
<i>Clostridium innocuum</i>	44	26	0,0596	31,4	21,1
<i>Bacteroides fragilis</i>	20	10	0,1170	14,3	8,1
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	14	6	0,1179	10,0	4,9
<i>Bacteroides thetaiomicon</i>	24	13	0,1261	17,1	10,6
<i>Enterococcus faecium</i>	31	19	0,1674	22,1	15,5
<i>Candida albicans</i>	22	13	0,2203	15,7	10,6
<i>Coprobacillus cateniformis</i>	12	6	0,2367	8,6	4,9
<i>Collinsella aerofaciens</i>	24	15	0,2600	17,1	12,2

Dále jsme modelovali možnost využití kombinace druhů signifikantně asociovaných s CRC v našem souboru pro screening CRC. Přestože došlo u druhu *B. fragilis* ke ztrátě signifikance, zahrnuli jsme ho do tohoto modelu také, protože toxin produkovaný touto bakterií byl prokazatelně asociován s CRC v jiných studiích. Pro bakteriální druhy *C. ramosum*, *C. perfringens* a *B. fragilis* byla vypočítána p hodnota v závislosti na použití jejich vzájemných kombinací (Tabulka 12).

Tabulka 12. Hodnota p pro kombinace bakteriálních druhů se zvýšeným výskytem u CRC pacientů starších 50 let

	140 CRC	123 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
<i>C. ramosum, B. fragilis</i>	41	13	<0,001	29,3	10,6
<i>C. ramosum, C. perfringens</i>	40	13	<0,001	28,6	10,6
<i>B. fragilis, C. perfringens</i>	36	18	0,027	25,7	14,6
<i>C. ramosum, C. perfringens, B. fragilis</i>	52	21	<0,001	37,1	17,1

Tabulka zahrnuje případy, u kterých byl detekován alespoň jeden z uvedených bakteriálních druhů.

Dále byla, stejně jako pro soubor všech 290 pacientů, i pro pacienty starší 50 let vypočítána signifikance u bakteriálních druhů, které se naopak vyskytovaly ve zvýšeném počtu u kontrol než u CRC pacientů (Tabulka 13).

Tabulka 13. Vybrané bakteriální druhy se zvýšeným výskytem u kontrol starších 50 let (způsob výběru viz text)

	140 CRC	123 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	24	0,0029	7,1	19,5
<i>Lactobacillus gasseri</i>	5	12	0,0418	3,6	9,6
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	11	0,069	3,6	8,9

Podobně jako u druhů asociovaných s CRC jsme i druhů asociovaných s absencí CRC modelovali jejich možné využití pro vyloučení rizika CRC (Tabulka 14).

Tabulka 14. Hodnota p pro kombinace bakteriálních druhů se zvýšeným výskytem u kontrol starších 50 let

	140 CRC	123 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
<i>S. epidermidis, L. gasseri</i>	15	31	0,0020	10,7	25,2

Tabulka zahrnuje případy, u kterých byl detekován alespoň jeden z uvedených bakteriálních druhů.

## 4.2 Genetická analýza izolátů

### 4.2.1 Genetická analýza izolátů *Escherichia coli*

Byla provedena charakterizace 393 bakterií druhu *E. coli* izolovaných od 265 pacientů. Od 136 pacientů s diagnostikovaným CRC bylo získáno 216 izolátů *E. coli*. Z nich byl u



70 izolátů náležících 60 pacientům detekován genomický ostrov pks kódující toxin kolibaktin. Od 129 pacientů, kteří sloužili jako zdravé kontroly, bylo izolováno 177 bakterií *E. coli*. Z nich byla u 47 izolátů od 42 pacientů prokázána přítomnost kolibaktinu. Přítomnost genu kódujícího kolibaktin se blížila statistické významnosti u izolátů od pacientů s CRC v porovnání s počtem pozitivních izolátů od zdravých kontrol ( $p = 0,053$ ). Diagnózy CRC pacientů, od kterých byly kultivovány pks+ *E. coli*, jsou uvedeny v Tabulce 15. Diagnózy pacientů představujících skupinu zdravých kontrol, u kterých byl detekován gen pro kolibaktin, jsou shrnuty v Tabulce 16.

Tabulka 15. Diagnózy CRC pacientů, od kterých byly izolovány pks+ *E. coli*

Diagnóza	Počet pacientů
ZN-konečniku	17
ZN-esovitý tračník	13
ZN-rektosigmoideální spojení	8
ZN-vzestupný tračník	8
ZN-slepé střevo	7
ZN-slezinné ohbí	2
ZN-sestupný tračník	2
ZN-červovitý přívěsek	1
Adenom rekta	1
Karcinom rekta	1
<b>Celkem</b>	<b>60</b>

ZN = zhoubný novotvar

Tabulka 16. Shrnutí diagnóz kontrolní skupiny pacientů, od kterých byly izolovány pks+ *E. coli*

Diagnóza	Počet pacientů
Kýla	22
Kámen žlučníku	9
Hemeriody	5
Malignita mimo tlusté střevo	2
Jiné	4
<b>Celkem</b>	<b>42</b>

Z celkového testovaného souboru 393 izolátů byla pozorována hemolytická aktivita u 51 kmenů izolovaných od 46 pacientů s CRC a u 29 *E. coli* izolovaných od 28 jedinců bez diagnózy CRC. Asociace hemolytické aktivity izolátů s diagnózou CRC dosáhla statistické významnosti ( $p = 0,027$ ). Zároveň byla přítomnost ostrovu pks prokázána u 46 hemolytických kmenů získaných od 41 pacientů s CRC. Všechny pks+ izoláty vykazující hemolytickou aktivitu byly zároveň zařazeny do fylogenetické skupiny B2, která se

vyznačuje vysokou virulenci. Nicméně zohlednění kombinace přítomnosti genu pro kolibaktin a hemolytické aktivity izolátů získaných od CRC pacientů nepatrně snížilo statistickou významnost ( $p = 0,028$ ).

Dále bylo všech 393 izolátů *E. coli* otestováno na přítomnost genů *cdt* a *cnf1*. Gen kódující toxin CNF byl detekován u 68 izolátů získaných od 64 pacientů. Z toho bylo 40 pacientů s diagnostikovaným CRC a 24 kontrol ( $p=0,040$ ). Gen kódující toxin CDT byl prokázán u 24 izolátů náležících 20 pacientům. Z toho bylo 10 CRC pacientů a 10 kontrol ( $p=0,902$ ).

#### 4.2.1.1 Statistická analýza detekovaných genů u *E. coli* od pacientů starších 50 let

Vzhledem k tomu, že se screeningové vyšetření pro CRC provádí z důvodů obecného populačního rizika jen u osob starších 50 let (včetně), posoudili jsme asociaci přítomnosti potenciálních CRC markerů zvláště také pro tuto věkovou skupinu. Pro srovnání jsme stanovili také  $p$  hodnotu pro asociaci kolibaktinu s CRC u pacientů mladších 50 let. U této skupiny nebyla statistická významnost prokázána, především z důvodu malého počtu účastníků ( $p=0,224$ ).

Soubor osob starších 50 let obsahoval celkem 241 pacientů, z toho 130 CRC pacientů a 111 kontrol. *E. coli* kódující kolibaktin byla detekována u 59 pacientů s CRC a u 34 jedinců z kontrolní skupiny ( $p = 0,019$ ). Diagnózy těchto pacientů jsou shrnuty v Tabulkách 17 a 18.

Tabulka 17: Diagnózy CRC pacientů starších 50 let, od kterých byly izolovány pks+ *E. coli*

<b>Diagnóza</b>	<b>Počet pacientů</b>
ZN-konečník	17
ZN-esovitý tračník	13
ZN-rektosigmoideální spojení	7
ZN-vzestupný tračník	8
ZN-slepé střevo	7
ZN-slezinné ohbí	2
ZN-sestupný tračník	2
ZN-červovitý přívěsek	1
Adenom rekta	1
Karcinom rekta	1
<b>Celkem</b>	<b>59</b>

ZN = zhoubný novotvar

Tabulka 18. Diagnózy kontrol starších 50 let, od kterých byly izolovány pks+ *E. coli*

Diagnóza	Počet pacientů
Kýla	20
Kámen žlučníku	9
Hemeroidy	2
Malignita mimo tlusté střevo	1
jiné	2
<b>Celkem</b>	<b>34</b>

Statistická významnost byla potvrzena také u genu kódujícího toxin CNF ( $p = 0,020$ ) a u hemolytické aktivity *E. coli* ( $p = 0,017$ ) (Tabulka 19). Zároveň byla schopnost hemolýzy prokázána u 67,8 % kolibaktin-pozitivních izolátů od CRC pacientů (40/59). Dále byly vypočítány  $p$  hodnoty pro kombinace zmiňovaných signifikantních markerů u CRC pacientů (Tabulka 20).

Tabulka 19. Shrnutí statisticky významných CRC markerů u pacientů starších 50 let

	130 CRC	111 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
Kolibaktin	59	34	0,019	45,4	30,6
CNF	39	19	0,020	30,3	17,1
hemolýza	45	23	0,017	34,6	20,7

Tabulka 20. Hodnota  $p$  pro kombinace CRC markerů u pacientů starších 50 let

	130 CRC	111 kontrol	p	Zastoupení (%)	
				CRC	kontroly
Kolibaktin, CNF	61	35	0,015	46,9	31,5
Kolibaktin, hemolýza	64	37	0,013	49,2	33,3
Kolibaktin, CNF, hemolýza	64	37	0,013	49,2	33,3

Tabulka zahrnuje případy, u kterých byl detekován alespoň jeden z uvedených bakteriálních markerů.

#### 4.2.1.2 Souhrnné modelování využitelnosti potenciálních markerů u pacientů starších 50 let

Pro vyhodnocení celkového potenciálu přínosu všech druhových i toxinových markerů pro predikci statutu CRC versus kontrola jsme navrhli skórovací systém, ve kterém vyšší skóre odpovídá vyššímu riziku CRC a pravděpodobnějšímu přiřazení osoby do skupiny CRC+. Pro bakteriální druhy a toxiny, které byly asociovány s CRC s parametrem  $P \leq 0,05$ , byl zvolen příspěvek ke skóre ve výši +1 bod. Pro *B. fragilis*, který byl asociován signifikantně s CRC pouze v celém souboru bez věkového omezení, ale už ne ve skupině osob starších 50 let, byl zvolen příspěvek ke skóre +0,5 bodu. Pro bakteriální druhy, které

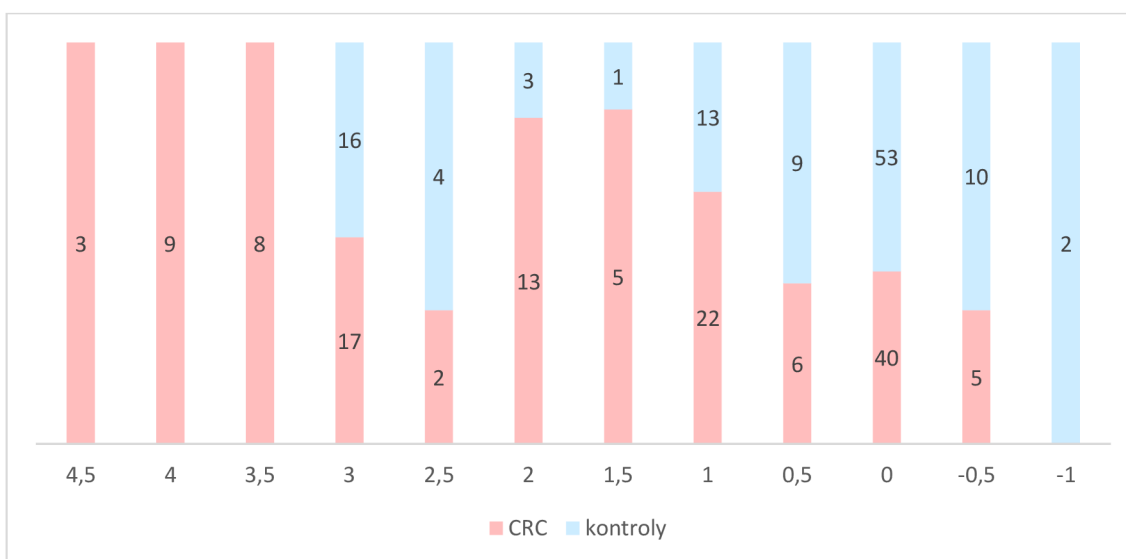
byly asociovány s absencí CRC s parametrem  $P \leq 0,05$ , jsme zvolili příspěvek v podobě snížení skóre  $-0,5$  bodu. Pro tyto bakteriální druhy jsme zvolili poloviční váhu vlivu na celkové skóre na základě úvahy, že druhy pozitivně asociované s CRC mohou pravděpodobně přispívat k rozvoji CRC aktivně, zatímco druhy asociované s absencí CRC mohou být pravděpodobně spíše známkou zdravějšího složení střevního mikrobiomu. To jinými slovy znamená, že pravděpodobně neeliminují škodlivý vliv bakterií pozitivně asociovaných s CRC v plném rozsahu, ale pouze částečně. Námí navržený skórovací systém shrnuje přehledně Tabulka 21.

Tabulka 21. Body přidělené jednotlivým markerům pro modelové skórování rizika CRC.

Marker CRC/kontrol	Počet bodů
Kolibaktin	+1
CNF	+1
Hemolýza	+1
<i>C. perfringens</i>	+1
<i>C. ramosum</i>	+1
<i>B. fragilis</i>	+0,5
<i>S. epidermidis</i>	-0,5
<i>L. gasseri</i>	-0,5

Účastníci studie byli rozděleni do kategorií podle hodnoty dosaženého skóre a v každé kategorii bylo vyhodnoceno zastoupení CRC+ účastníků a kontrol. Výsledek shrnuje Graf 1.

Graf 1. Kategorie pacientů na základě dosaženého skóre



horizontální osa – počet pacientů; vertikální osa – oskórované kategorie pacientů

Účastníci se skóre 4,5; 4 a 3,5 byli tvořeni výhradně pacienty CRC+, s klesajícím skóre očekávatelně rostlo zastoupení kontrol, účastníci se skóre -1 jsou tvořeni pouze kontrolami. Kategorie -0,5 až 1,5 obsahovaly se vzrůstajícím skóre zvyšující se počet CRC pacientů a zároveň snižující se počet kontrol. V kategorii 2,5 však bylo zahrnuto víc kontrol než CRC pacientů, přestože bychom předpokládali narůstající počet pacientů s CRC. Tento výkyv však můžeme přisuzovat malému počtu jedinců v této kategorii, kdy i jeden pacient způsobí výrazný poměrový rozdíl.

Navržený skórovací systém jsme poté interně validovali na našem souboru pacientů z hlediska odhadu sensitivity a specifity screeningu při nastavení jednotlivých hodnot skóre jako hranice pro vyslovení podezření na CRC a doporučení další cílené diagnostiky. Výsledky shrnuje Tabulka 22.

Tabulka 22. Odhad sensitivity a míra falešně pozitivních výsledků pro jednotlivé hranice skóre.

Skóre $\geq$	Procento správně detekovaných CRC+ pacientů (odhad sensitivity)	Procento falešně pozitivních výsledků (odhad specifity)	Poměr mezi správně a falešně detekovanými případy CRC
4,5	2,3	0	1 : 0
4	9,2	0	1 : 0
3,5	15,4	0	1 : 0
3	28,5	14,4	1 : 0,51
2,5	30	18	1 : 0,6
2	40	20,7	1 : 0,52
1,5	43,8	21,6	1 : 0,49
1	60,8	33,3	1 : 0,54
0,5	65,4	41,4	1 : 0,63
0	96,2	89,2	1 : 0,93
-0,5	100	98,2	1 : 0,98
-1	100	100	1 : 1

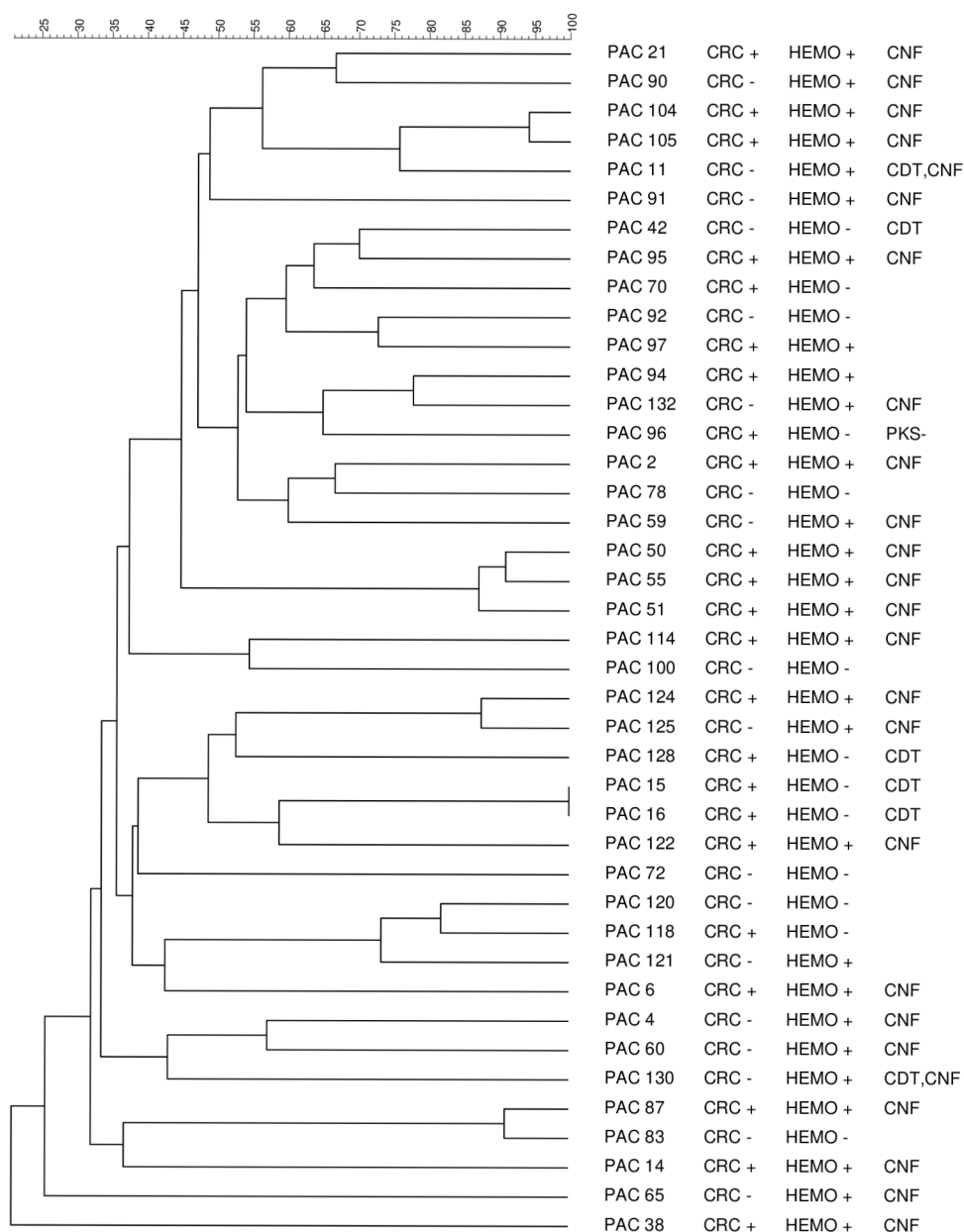
Dle očekávání, procento správně detekovaných CRC pacientů rostlo s klesajícím skóre kategorií, zároveň ale samozřejmě rostlo procento falešně pozitivně detekovaných kontrol. Odhad těchto parametrů na našem souboru je samozřejmě pouze orientační, vzhledem k omezené velikosti našeho vzorku, který navíc nebyl vybírán z obecné populace. Pro stanovení optimálního prahového skóre pro doporučení další verifikace rizika jsme se nicméně alespoň pokusili srovnat míru sensitivity s falešnou pozitivitou

(poslední sloupec Tabulka 22). Takto arbitrárně se jeví jako nejvýhodnější skóre 0,5 až 1 (cca dva správně detekovaní CRC+ pacienti na cca jednoho falešně pozitivního).

#### 4.2.1.3 Klonální analýza pks+ izolátů *E. coli* pomocí RAPD PCR

Pro zjištění případné klonality izolátů *E. coli*, které pocházely od pacientů s diagnostikovaným CRC, byla použita genotypizační metoda RAPD PCR. Pro RAPD analýzu bylo vybráno 40 kmenů pks+ *E. coli* a 1 kmen pks- *E. coli*. Izolát pks- byl zahrnut proto, abychom zjistili, jestli se výrazněji liší svým RAPD profilem od pks+ izolátů. Pouze dva izoláty od pacientů 15 a 16 vykazovaly příslušnost ke stejnému klonu. Oba tyto izoláty shodně vykazovaly hemolytickou aktivitu a zároveň u nich byl detekován gen pro CDT, což dále podporuje jejich velmi pravděpodobnou příslušnost ke stejnému klonu. RAPD profily ostatních testovaných izolátů byly velice odlišné, nekorelovaly s diagnózou pacienta ani se schopností kmene hemolyzovat nebo s detekovanými geny pro toxiny CNF či CDT u daného izolátu (Obr. 8).

Obr. 8. Dendrogram vybraných izolátů *E. coli*



horizontální osa - příbuznost izolátů (%); vertikální osa - charakteristika příslušného izolátu:  
 PAC označení pacienta, od kterého byl kmen izolován  
 CRC+/- diagnóza pacienta  
 HEMO +/- schopnost kmene hemolyzovat  
 CDT/CNF detekce příslušného genu kódující toxin CDT nebo CNF u daného kmene  
 PKS – nepřítomnost genu pro kolibaktin

## 4.2.2 Genetická analýza izolátů *Bacteroides fragilis*

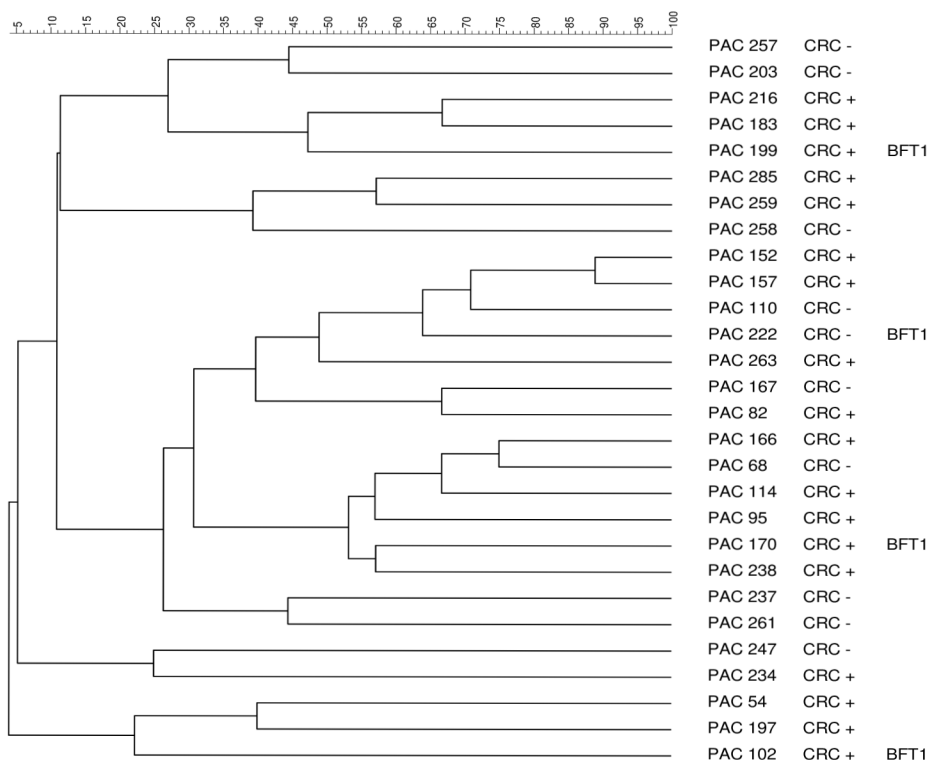
### 4.2.2.1 Detekce enterotoxigenních kmenů *B. fragilis*

Z celkových 32 izolátů *B. fragilis*, zamražených v průběhu studie pro pozdější analýzu, se podařilo revitalizovat 28 kmenů, ze kterých byla izolována DNA a následně provedena PCR detekce 3 typů genů kódujících BFT. Typy *bft2* a *bft3* nebyly prokázány vůbec, nicméně byly detekovány 4 izoláty *B. fragilis* nesoucí gen *bft1*. Z toho 3 izoláty byly od pacientů s CRC a zbývající jeden pozitivní izolát byl od kontrolního pacienta. Pro nízký počet izolátů *B. fragilis* však nebylo možné tento jev statisticky vyhodnotit.

### 4.2.2.2 Klonální analýza izolátů druhu *B. fragilis* pomocí RAPD PCR

Všech 28 izolátů druhu *B. fragilis* bylo typizováno pomocí RAPD PCR. Mezi izoláty nebyla potvrzena zřetelná klonalita, ani izoláty s detekovaným genem *bft1* nebyly přiřazeny k žádnému naznačenému shluku (Obr. 9.). Nebyla teda prokázána žádná korelace mezi izoláty disponujícími genem pro toxin BFT a jejich klonalitou.

Obr. 9. Dendrogram izolátů *B. fragilis*



horizontální osa - příbuznost izolátů (%); vertikální osa - charakteristika příslušného izolátu:

PAC označení pacienta, od kterého byl kmen izolován

CRC+/- diagnóza pacienta

BFT1 detekce genu *bft1*



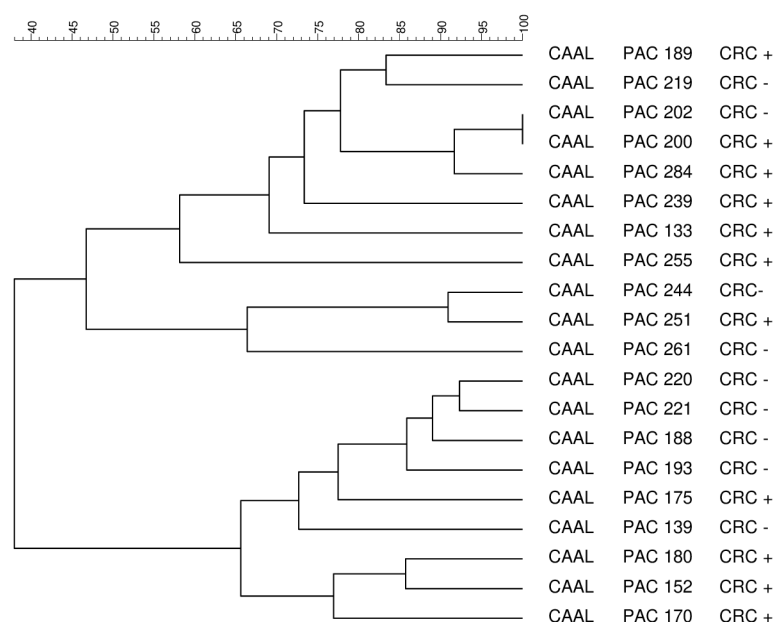
### 4.2.3 Genetická analýza izolátů *Candida albicans*

#### 4.2.3.1 Klonální analýza izolátů *C. albicans* pomocí RAPD PCR

Při předběžném vyhodnocení dat v průběhu studie byla pozorována signifikance u *C. albicans* ve vazbě na CRC pacienty ( $p = 0,007$ ) (Starý et al. 2020). Proto byly izoláty *C. albicans* zamražovány za účelem další charakterizace. Nicméně po finálním zpracování dat od celého souboru pacientů už nebyla signifikance *C. albicans* potvrzena. Abychom vyloučili, že asociace s CRC může být specifická jen pro určitý klon izolátů *C. albicans*, provedli jsme i u tohoto druhu klonální analýzu.

Přestože bylo celkem vykultivováno 37 izolátů kvasinek druhu *C. albicans*, pro typizaci bylo dostupných pouze 20 izolátů. Klonalita byla prokázána pouze u izolátů od dvou pacientů (pac. 202 a pac. 200) (Obr. 10.). Tito pacienti však spadali do odlišných diagnostických skupin, proto zde opět nebyla prokázána žádná asociace mezi určitým RAPD profilem a diagnózou CRC. U všech typizovaných izolátů *C. albicans* byla zároveň provedena PCR reakce detekující gen pro toxin kandidalyzin. U všech izolátů kvasinek byl tento gen detekován.

Obr. 10. Dendrogram izolátů *C. albicans*



horizontální osa - příbuznost izolátů (%); vertikální osa - charakteristika příslušného izolátu:

CAAL *Candida albicans*

PAC označení pacienta, od kterého byl kmen izolován

CRC+/- diagnóza pacienta

## 5 DISKUSE

### 5.1 Bakterie asociované s CRC a kontrolní skupinou pacientů

#### 5.1.1 Bakteriální druhy se zvýšeným výskytem u CRC pacientů

##### 5.1.1.1 *Fusobacterium nucleatum*

Mezi anaerobní bakteriální druhy, u kterých již byla potvrzena zvýšená prevalence u CRC pacientů, patří jednoznačně *F. nucleatum* (Zorron Cheng Tao Pu et al. 2020; Tunsjø et al. 2019; Suehiro et al. 2017). V naší studii jsme pomocí kultivačních technik nezachytili bakterie druhu *F. nucleatum*, což přisuzujeme zejména snížené schopnosti detekce striktně anaerobních druhů pomocí kultivačních metod oproti výsledkům z metagenomických studií a výsledkům za použití PCR detekce přímo z klinického materiálu. Tento fakt byl demonstrován i ve studii Chakvetadze a kol., kde byl potvrzen záchyt *F. nucleatum* pomocí PCR u kultivačně negativních vzorků (Chakvetadze et al. 2017). S tím korelují také naše výsledky nulového záchytu druhů *F. nucleatum* za použití kultivace. To představuje značnou limitaci této studie, nicméně naším cílem bylo detekovat příp. nové kultivovatelné markery CRC, které by bylo možné levně diagnostikovat v běžné rutinní laboratoři.

##### 5.1.1.2 *Bacteroides fragilis*

Mezi další anaerobní bakteriální druhy asociované s CRC patří *B. fragilis* (Haghi et al. 2019; Purcell et al. 2017). Opět se jedná o kultivačně náročnou bakterii, což potvrzuje studie Zamani a kol., kde byla pozorována nižší účinnost detekce pomocí kultivačních technik ze vzorků od CRC pacientů (32/68) oproti detekci 16S rRNA přímo z biopsií (68/68) (Zamani et al. 2020). U bakterií druhu *B. fragilis* se nám nicméně i kultivací podařilo prokázat signifikantně vyšší výskyt u CRC pacientů oproti kontrolám v rámci celého souboru pacientů bez ohledu na věk ( $p = 0,034$ ). U tohoto bakteriálního druhu byla v publikacích demonstrována schopnost některých kmenů produkovat toxin BFT, jehož mechanismus účinku je spojován s indukovanou karcinogenezí, progresí tumorů a vyšší mortalitou u myší exponovaných kmenům ETBF (Chung et al. 2018; Wu et al. 2009; Dejea et al. 2018).

#### 5.1.1.2.1 Genetická analýza izolátů *B. fragilis*

Po otestování souboru izolátů *B. fragilis* jsme potvrdili přítomnost genu pro BFT pouze u 4 izolátů z 28, z nichž 3 náležely pacientům CRC. Vzhledem k nízkému počtu izolátů však nelze určit statistickou významnost tohoto nálezu. Pro detekci genu BFT byly v naší studii použity primery pro specifickou amplifikaci genů kódující všechny tři doposud známé izoformy BFT (BFT-1, BFT-2 a BFT-3). U všech BFT-pozitivních izolátů byl detekován pouze typ BFT1, který byl u BFT-pozitivních izolátů nejčastěji zastoupen také v recentní studii Zamani a kol (56,2 %) (Zamani et al. 2020) a ve studii Ulger a kol. (27/31 BFT-pozitivních CRC pacientů) (Ulger et al. 2006). V práci Haghi a kol. byl oproti tomu detekován nejčastěji typ BFT-2 u izolátů *B. fragilis* od pacientů s pokročilejším stádiem CRC (Haghi et al. 2019), což koreluje s výsledky již dříve publikovaných studií (Boleij et al. 2015; Viljoen et al. 2015). Bylo také prokázáno, že exprese toxinu typu BFT-2 je nezbytná pro ETBF- indukovanou tumorigenezi (Allen et al. 2019), nicméně stále je zde možnost potvrzení významné role toxinu typu BFT1 v etiopatogenezi CRC v budoucnu.

Pro doplnění byla u izolátů *B. fragilis* provedena klonální analýza. Po RAPD analýze však nebyla potvrzena klonalita ani u jednoho páru izolátů. Výsledné zjištění koreluje s původem izolátů, neboť pocházely od ambulantních pacientů. Nejednalo se o hospitalizované pacienty z jednoho oddělení, kde by se klonalita izolátů mohla předpokládat. Důvodem velké variability RAPD profilů může být také vysoká citlivost této genotypizační metody, která je schopna detekovat SNP.

#### 5.1.1.3 Bakterie rodu *Clostridium*

Mezi další bakterie, které jsou studovány ve spojitosti s rizikem rozvoje CRC patří rod *Clostridium*. Obecně je většina zástupců tohoto rodu bakterií negativně asociována s CRC, protože při mikrobiální fermentaci nerozpustné vlákniny v tlustém střevě produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako jsou acetát nebo butyrát. Právě butyrát-produkující bakterie jsou považovány za prospěšné střevní sliznici. Butyrát totiž poskytuje potřebnou energii kolonocytům a zlepšuje propustnost střev. Navíc byl prokázán antikancerogenní účinek *Clostridium butyricum* prostřednictvím modulace Wnt signalizační dráhy, jejíž alterace je spojována se zvýšenou proliferací kolonocytů (D. Chen et al. 2020; Aghabozorgi et al. 2020). Není tedy překvapující, že u CRC pacientů

bylo již dříve prokázáno snížení výskytu těchto bakterií (Weaver et al. 1988; H. M. Chen et al. 2013).

U některých druhů rodu *Clostridium* byla ale naopak zaznamenána zvýšená míra detekce u CRC pacientů. Konkrétně druh *Clostridium symbiosum* byl navrhnut jako CRC marker pro neinvazivní detekci časných stadií CRC na základě jeho zvýšeného výskytu u CRC pacientů (Xie et al. 2017). V našem uspořádání kultivace jsme ale *C. symbiosum* v žádném vzorku, podobně jako *F. nucleatum*, nezachytili.

#### 5.1.1.3.1 *C. perfringens*

Kromě *C. symbiosum* byla v retrospektivní studii u pacientů s pozdějším výskytem CRC statisticky významně asociována také detekce *C. perfringens* v krevním řečišti rutinními hemokultivačními metodami ( $p=0,017$ ) (Kwong et al. 2018). Tento druh jsme významně častěji detekovali u CRC diagnóz oproti kontrolní skupině jedinců také v naší studii, a to jak v celém souboru pacientů bez ohledu na věk ( $p = 0,006$ ), tak u pacientů starších 50 let ( $p = 0,019$ ).

Přestože byly publikovány studie potvrzující zvýšenou prevalenci těchto bakterií u CRC pacientů, není zatím zcela jasné, zda se jedná o bakterii, která se na tumorigenezi aktivně podílí (tzv. driver) nebo pouze využívá podmínek vytvořených tumorigenezí ke zmnožení/kolonizaci (tzv. passenger). Bakterie *C. perfringens* mohou produkovat řadu toxinů, které se uplatňují v etiologii střevních onemocnění jako jsou enterokolitidy, průjemy nebo enterotoxémie (Rood et al. 2018). Zejména u enterotoxinu *Clostridium perfringens* (CPE), byl potvrzen destruktivní účinek na kolonocyty exponovaných králíků, což může vysvětlovat nekrotizující kolitidy u pacientů, od kterých byly izolovány kmeny *C. perfringens* typu A (Garcia et al. 2014; Ogbu, Roy, and Vecchio 2022). Vzhledem k rozsáhlé paletě toxinů u tohoto bakteriálního druhu by se měla možnost zapojení některého z nich při rozvoji CRC vzít v potaz.

#### 5.1.1.3.2 *C. ramosum*

Nejvyšší statistickou signifikanci se nám však podařilo dosáhnout u bakterie, která z doposud publikovaných prací nebyla spojována s CRC, a sice u izolátů druhu *C. ramosum* v rámci celého souboru pacientů ( $p = 0,025$ ), i v souboru pacientů nad 50 let ( $p < 0,001$ ). Další charakterizace tohoto souboru izolátů by mohla odhalit nebo alespoň nastínit, zda tyto bakterie vystupují pouze jako pasivní „pasažéři“, nebo disponují faktorem virulence, který by se mohl přímo účastnit v jedné z mnoha kaskád vedoucích

k tumorigenezi. V této souvislosti je velmi zajímavá studie, asociující – sice na malém vzorku pacientů a kontrol – ale signifikantně výskyt *C. ramosum* s karcinomem nosohltanu (Jiang et al. 2019). S výskytem karcinomu nosohltanu byla v této studii zároveň pozitivně asociována zvýšená hladina aminokyseliny 5-hydroxytryptaminu (5-HT, serotonin), která byla zároveň těsně svázána s pozitivní detekcí *C. ramosum* ve flóře tlustého střeva ( $p < 0,001$ ). Aminokyselina 5-HT je mimo jiné důležitý vazoaktivní neurotransmitter, produkovaný nejen buňkami CNS, ale také tzv. enterochromafinními (též Kulčického) neuroendokrinními buňkami, které jsou disperzně přítomny ve střevní sliznici. Na myším modelu bylo navíc již dříve prokázáno, že buněčné komponenty *C. ramosum* mají schopnost stimulovat sekreci 5-HT ve střevě (Mandić et al. 2019). U kolorektálního karcinomu byla přitom popsána stimulace progresu a metastatické aktivity vlivem 5-HT (Sui et al. 2015). Kromě toho byla již dříve zdokumentována také souvislost zvýšené dostupnosti 5-HT ve střevě s obezitou (Woting et al. 2014), která je dlouhodobě prokázaným faktorem zvýšeného rizika vývoje kolorektálního karcinomu.

#### 5.1.1.4 *Candida albicans* jako možný, avšak nesignifikantní CRC marker

Kvasinky druhu *C. albicans* byly dle průběžného vyhodnocení našich dat řazeny mezi signifikantní CRC markery (Starý et al. 2020), nicméně po vyhodnocení celého souboru pacientů už byla u *C. albicans* zaznamenána ztráta signifikance ( $p = 0,0716$ ). Proto byly izoláty *C. albicans* podrobeny klonální analýze, kde jsme očekávali identický RAPD profil u izolátů od pacientů se stejnou diagnózou. Pomocí RAPD PCR však byly získány různorodé profily izolátů a klonalita se podařila potvrdit pouze u jednoho páru izolátů. Každý izolát však pocházel od pacienta s odlišnou diagnózou (jeden od CRC pacienta a druhý od kontroly). Vzhledem k literárním údajům, které přinášejí nepřímé důkazy o asociaci mezi infekcí *C. albicans* a tumorigenezí, příp. progresí nádorů (Rodríguez-Cuesta et al. 2010; Nørgaard et al. 2013; Ramirez-Garcia et al. 2014) se domníváme, že je opodstatněné považovat *C. albicans* nadále za možný marker CRC a zaměřit se v budoucích studiích na možnou asociaci kvantitativního zastoupení této kvasinky v tlustém střevě s vývojem CRC.

#### 5.1.1.5 Potenciál detekce anaerobních bakterií jako CRC markerů

Modelování možnosti využití druhů signifikantně asociovaných s CRC pro screening jedinců starších 50 let přinesla slibné výsledky. V případě kultivačního průkazu alespoň

jednoho z následujících bakteriálních druhů: *C. ramosum*, *C. perfringens*, *B. fragilis*, byla na našem vzorku zjištěna míra detekce u CRC pacientů 37,1 % ( $p < 0,001$ ). Standardní neinvazivní screeningovou metodou s vysokou sensitivitou a specifitou je v současné době detekce FOBT vylepšená pomocí imunologických technik (FIT). Tato metoda ale vyžaduje samosběr vzorků stolice velikosti lískového ořechu, což je jedním z faktorů, který snižuje ochotu obecné populace k tomuto způsobu screeningu CRC. Výhodou námi testované detekce rizikových jedinců pomocí kultivace je, že výchozím vzorkem je jednorázový výtěr z konečníku, který může být proveden kdykoli bez závislosti na defekaci. Na druhé straně je vhodné, aby tento odběr byl proveden odborným personálem. Nabízí se proto možnost potenciálně výhodné kombinace obou technik, která by ale samozřejmě před širokým použitím vyžadovala posouzení, zda skutečně zvýší celkovou účinnost screeningu CRC v populaci.

V naší představě by mohlo být provedení takového screeningu zvaženo při každé návštěvě lékaře nebo zdravotnického zařízení s ohledem k příslušnosti pacienta k obecné rizikové populaci nad 50 let. Pokud by bylo zjištěno, že konkrétní pacient do této skupiny patří a nebyl u něj FOBT screening v posledním roce proveden, nebo neabsolvoval v posledních 5 letech screeningovou kolonoskopii s negativním výsledkem, byly by mu nabídnuty oba typy screeningu (samoodběr stolice pro FOBT a odběr na kultivaci) s řádným poučením, že FOBT je metoda standardní a vyzkoušená, zatímco kultivace je doplňková, která může zvýšit citlivost screeningu. Lze předpokládat:

- a) Pacienti, kteří by přistoupili na obě nabídky by mohli profitovat z případného dodatečného zachytu rizika při pozitivní kultivaci, ale negativním FOBT. Tito by pak byli motivováni podstoupit k vyloučení nálezu diagnostickou kolonoskopií, nebo, pokud by ji z nějakého důvodu nepodstoupili, by byli více motivováni k pravidelnému ročnímu opakování FOBT.
- b) Pacienti, kteří by přistoupili na obě nabídky a FOBT by u nich byl pozitivní, by nebyli kultivačním screeningem nijak dodatečně zatíženi a byla by jim standardně doporučena diagnostická kolonoskopie.
- c) Pacienti, kteří by z důvodu potřeby samoodběru stolice odmítli FOBT nebo tuto proceduru řádně nedokončili, by mohli v případě pozitivního výsledku kultivace profitovat z nízkoprahovosti tohoto typu screeningu.

## 5.1.2 Bakteriální druhy asociované se zdravou mikroflórou střev

### 5.1.2.1 *Staphylococcus epidermidis*

V naší studii byla potvrzena signifikantní asociace výskytu bakteriálního druhu *S. epidermidis* u kontrol oproti CRC pacientům v celém souboru pacientů ( $p = 0,038$ ) a také v souboru pacientů starších 50 let ( $p = 0,003$ ). *S. epidermidis* je producentem nedávno objevených termo-rezistentních molekul, kdy předběžná charakterizace jejich aktivity zahrnovala rezistenci k působení trypsinu, proteinázy K a k inhibitorům proteáz, což naznačuje nebílkovinnou povahu těchto molekul. Dále byla pomocí sekvenace RNA zjištěna schopnost těchto molekul ovlivňovat expresi genů *Staphylococcus aureus*, které jsou spojovány s tvorbou biofilmu (Glatthardt et al. 2020). Recentní výzkumy se na komenzální bakterie *S. epidermidis* zaměřují právě kvůli jeho antagonistickému působení vůči kožním patogenům jako je *C. albicans* nebo *Leishmania major* (Parlet, Brown, and Horswill 2019; Naik et al. 2012). Z dostupných prací se zatím neuvažuje o *S. epidermidis* jako o bakterii působící prospěšně na střevní sliznici, nicméně naše výsledky poukazují na možnost, že podobně, jako na kůži, zde může významně bránit kolonizaci oportunním patogenům a podporovat tak udržení homeostázy.

Na druhé straně je potřeba také vzít v potaz skutečnost, že *S. epidermidis* se dominantně vyskytuje právě na kůži a při výtěru z konečníku musí nutně docházet k mechanickému kontaktu výtěrového tampónu s kůží v okolí řitního otvoru. Výskyt této bakterie ve vzorcích proto nemusí nutně reprezentovat její výskyt v tlustém střevě. Protože je ale detekovaná asociace s absencí CRC jasně signifikantní, můžeme jen spekulovat, jaký mechanismus by mohl být případně zodpovědný za zvýšenou detekci *S. epidermidis* ve stěrech z kůže v okolí análního otvoru u kontrol.

### 5.1.2.2 *Lactobacillus gasseri*

V souboru pacientů starších 50 let byl detekován také významně vyšší výskyt bakterie *L. gasseri* ( $p = 0,042$ ). U této bakterie není překvapující signifikantní zastoupení ve vzorcích od kontrolní skupiny oproti CRC pacientům, vzhledem k jeho prokázaným probiotickým a proti-zánětlivým účinkům (Carroll et al. 2007).

## 5.2 Genetická analýza izolátů *Escherichia coli*

### 5.2.1 Role toxinů při vzniku a rozvoji CRC

V řadě studií byla potvrzena pro-onkogenní aktivita genotoxinu kolibaktinu (Eric Oswald et al. 2005; Nougayrede 2006; Hernandez-luna and Lagunes-servin 2017). Proto byl kolibaktin v naší studii zařazen mezi toxiny s největším potenciálem pro detekci rizika CRC. Spolu s kolibaktinem byla popsána také řada dalších slibných faktorů, které by se mohly podílet na vývoji CRC, jako CNF a CDT, u nichž bylo pozorováno škodlivé působení na buňky střevní sliznice. U všech těchto zmíněných toxinů byla vysoká šance na potvrzení významnosti jejich výskytu u pacientů s CRC. V našem pilotním souboru izolátů se potvrdila statistická významnost u genů pro kolibaktin ( $p = 0,019$ ) a CNF toxin ( $p = 0,020$ ) u pacientů starších 50 let.

O genotoxickém působení kolibaktinu není pochyb, jak již bylo potvrzeno ve studii Pleguezuelos-Manzano a kol., kde byly detekovány delece a substituce v genomu lidských organoidů zapříčiněné expozicí kolibaktinu (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020). Zároveň bylo potvrzeno přímé zapojení kolibaktinu v etiologii CRC, což bylo demonstrováno poškozením DNA kolonocytů po jejich vystavení kolibaktinu (Dziubańska-Kusibab et al. 2020). Účinek kolibaktinu, který vede k mutacím indukujícím tvorbu tumorů ve střevě je nevyvratitelný. Nicméně stále je nutné uvažovat o lidském střevě jako o celku, kde působí další faktory ovlivňující působení tohoto genotoxinu.

Klíčovou roli v pro-onkogenním působení kolibaktinu má zcela určité exprese genů kódujících tento toxin, která je však závislá na zánětlivém mikroprostředí střev či pouhé dysbalanci mikrobioty. Zánět totiž může spustit aktivaci genů sousedících s geny pro toxin na pks ostrovu *E. coli*, což spustí stimulaci exprese kolibaktinu. Zároveň byla pozorována odlišná míra exprese genů pro kolibaktin v počáteční a v pozdější fázi vývoje CRC (Arthur et al. 2015). K podobným výsledkům dospěla také studie Bonnet a kol, ve které byly kolibaktin-produkující izoláty *E. coli* detekovány častěji u pacientů v rozvinutější fázi onemocnění CRC oproti počátečním fázím (Bonnet et al. 2014).

Kromě fáze onemocnění je exprese kolibaktinu závislá také na fenotypu CRC. Ve studii Gagnière a kol byly kolibaktin-produkující *E. coli* častěji zachyceny u pacientů s MSS CRC (microsatellite-stable CRC), což naznačuje různou míru působení kolibaktinu v odlišných typech CRC (Gagnière et al. 2017). Dále bylo pozorováno, že pro vývoj tumoru u buněk infikovaných kolibaktin-produkujícími *E. coli* je nutný počáteční impuls jako např. mutace APC (Bonnet et al. 2014). Přítomnost pks+ *E. coli* u dědičných typů



polypózních i nepolypózních forem CRC oproti sporadickému typu CRC však není zatím detailněji prostudována. Také zde hraje roli imunitní odpověď hostitele a genetické predispozice jedince, není proto snadné určit konkrétní úlohu a významnost kolibaktinu u CRC.

#### 5.2.1.1 Kolibaktin u zdravých lidí

Další studie naznačují, že i takto slibný marker CRC, kolibaktin, nemusí být vždy přímo spojován s onkologickým onemocněním, jako spíše se zánětlivým nebo chronickým onemocněním trávicí soustavy obecně (Arthur et al. 2015). Otázkou také stále zůstává přesný mechanismus působení kolibaktinu ve střevě. V mnoha studiích sice byla potvrzena schopnost kolibaktinu indukovat dvou-řetězcové zlomy v DNA, které mohou kaskádovitým procesem přispět k rozvoji CRC, nicméně přítomnost kolibaktinu ve střevě byla v řadě studií potvrzena také u zdravých lidí. Studie z různých zemí se sice v tomto ohledu liší, nicméně výskyt pks+ izolátů *E. coli* byl v mnoha výzkumech potvrzen také ve vysoké míře u zdravé kontrolní skupiny pacientů (Gagnière et al. 2017; Bossuet-Greif et al. 2016; Shimpoh et al. 2017; Raisch et al. 2014). Není ani pravidlem, že se pks+ izoláty vyskytují u pacientů s jiným zánětlivým onemocněním střev, neboť kolibaktin produkující kmeny *E. coli* byly detekovány také u zdravých novorozenců a mladých lidí bez chronického onemocnění trávicí soustavy (Payros et al. 2014; Secher, Brehin, and Oswald 2016). Zajímavé také je, že pks ostrov, na kterém je kódován toxin kolibaktin, je dokonce nutný pro protizánětlivý účinek probiotických kmenů *E. coli* Nissle 1917 (Olier et al. 2012). V této souvislosti je zajímavé naše zjištění, že pks+ genotyp byl s CRC signifikantně asociován pouze v případě, že jsme do testu významnosti zahrnuli pouze pacienty starší 50 let, u kterých významně stoupá obecné populační riziko vzniku CRC. Bohužel náš soubor pacientů mladších 50 let není dost velký na to, abychom byli schopni zhodnotit, že se příspěvek pks+ *E. coli* opravdu významně liší u populace mladší a starší 50 let. Pokud by ale pks+ *E. coli* pouze přispívala k tumorigenezi a její podpora vývoje CRC by vyžadovala přítomnost dalších faktorů, jak naznačují některé studie, rozdílný vliv kolibaktinu u pacientů mladších a starších 50 let by do takovéto logiky kancerogeneze CRC velmi dobře zapadal.

#### 5.2.2 Kombinovaná detekce kolibaktinu a CNF toxinu u CRC pacientů

I přes signifikantní výskyt kolibaktinu a CNF u *E. coli* izolovaných od CRC pacientů, nelze snadno posoudit jejich samostatné působení jako jednotlivých faktorů přispívajících

ke vzniku a rozvoji CRC, neboť stále musíme mít na paměti, že CRC je multifaktoriální onemocnění. V naší studii však vzrostla míra detekce u CRC pacientů při kombinované detekci kolibaktinu a/nebo CNF u CRC pacientů nad 50 let na 46,9 % ( $p = 0,015$ ). Dle našich dat spolu s publikacemi podporujícími naše výsledky bychom tedy mohli tvrdit, že kolibaktin a CNF mohou fungovat jako ko-faktory uplatňující se při rozvoji sporadického CRC.

### 5.2.3 Detekce hemolytických *E. coli* u CRC pacientů

V našem pilotním souboru izolátů se potvrdila také statistická významnost asociace schopnosti kmenů hemolyzovat na Columbia krevním agaru ( $p = 0,017$ ) s CRC v souboru pacientů starších 50 let. Navíc hemolýzu vykazovalo 67,8 % kolibaktin-pozitivních izolátů od CRC pacientů. K podobnému závěru došla studie Yoshikawa a kol, ve které byly charakterizovány kolibaktin-pozitivní *E. coli* izolované přímo z tumoru střeva. U 81,4% izolátů *E. coli* byla detekována schopnost hemolýzy, což také nasvědčuje významné asociaci hemolýzy u *E. coli* izolátů a CRC (Yoshikawa et al. 2020). V rámci charakterizace kolibaktin pozitivních izolátů byla u výběru těchto bakterií *E. coli*, z nichž 28 izolátů bylo hemolyticky aktivních, provedena klonální analýza. Po RAPD analýze však byla potvrzena klonalita pouze u jednoho páru izolátů od dvou pacientů, u kterých nebyla detekována hemolytická aktivita, ani gen pro toxin CNF, nicméně byla u nich prokázána přítomnost genu pro toxin CDT. V celkovém souboru izolátů však klonalita potvrzena nebyla.

### 5.2.4 Potenciál toxinů a hemolýzy u *E. coli* pro screening CRC

Po statistické analýze dat zahrnujících výskyt kolibaktinu, CNF a hemolýzy u *E. coli* od pacientům starších 50 let byla potvrzena statistická signifikance u kombinované detekce těchto tří faktorů ( $p = 0,013$ ) a zvýšená míra detekce u CRC pacientů starších 50 let (49,2 %). Proto by mohla sloužit triplexní PCR detekce těchto markerů u izolátů *E. coli*, kde by byl zachycen alespoň jeden z nich, jako doplňková neinvazivní metoda pro screening CRC.

## 5.3 Souhrnný potenciál druhových i toxinových CRC markerů

Pro posouzení celkového přínosu všech námi potvrzených statisticky významných CRC markerů (kolibaktin, CNF a hemolýza u izolátů *E. coli*, dále bakteriální markery *C. perfringens*, *C. ramosum* a *B. fragilis*) jsme navrhli skórovací systém, dle kterého byli

pacienti kategorizováni do skupin od nejmenšího k nejvyššímu skóre odpovídající stoupajícímu riziku CRC vzhledem k přítomnosti jednoho nebo více markerů. Ve skórovacím systému byly zahrnuty také bakteriální druhy, u kterých byl potvrzen signifikantně vyšší výskyt u kontrolní skupiny pacientů (*S. epidermidis*, *L. gasseri*). Tyto druhy tedy sloužily jako markery sníženého rizika CRC. Na základě přítomnosti/nepřítomnosti daného markeru byli jednotliví pacienti rozděleni do kategorií se skórem -1 (pacienti s nejnižším rizikem CRC) až +4,5 (pacienti s nejvyšším rizikem CRC). V našem modelu nebyly ohodnoceny parametry jako je pohlaví, věk a BMI index, které se ve skórovacích modelech pro posouzení souhrnné detekce rozdílných CRC biomarkerů také používají (Y. Wu et al. 2021). V našem případě se však jednalo o předběžně navržený skórovací systém obsahující z naší studie zjištěné signifikantní markery CRC i kontrol, které budou ještě muset projít procesem další validace a verifikace na obecné populaci. Pro orientační informaci, zda se při kombinované detekci více markerů zvýšeného nebo sníženého rizika CRC zároveň zvýší procento pravděpodobnosti zachytu rizikových pacientů by však tento navržený model měl postačovat. Faktem nicméně zůstává, že je zde vždy prostor pro zahrnutí dalších faktorů v případě zdokonalení tohoto skórovacího systému.

Pro celkové zhodnocení přínosu souhrnné detekce CRC markerů bylo stanoveno procento správně detekovaných CRC+ pacientů (odhad sensitivity) pro každou kategorii se skórem rovno nebo vyšším (-1 až +4,5). Vzhledem k tomu, že v našem případě jsme však nemohli zahrnout počet „falešně pozitivních“ pacientů, který je dosazován do běžně používané rovnice pro výpočet sensitivity metod, byla pro výpočet odhadu sensitivity sestavena rovnice podílu součtu všech CRC pacientů v kategorii rovno/vyš a celkového počtu všech CRC pacientů. Dle očekávání, procento správně detekovaných CRC pacientů rostlo s klesajícím skórem kategorií. Nejvyšší odhad sensitivity byl stanoven u kategorie se skórem -1 až 0, což koreluje s obecným faktem – čím vyšší citlivost metody, tím více vzorků je zachyceno, ovšem pravděpodobně s vyšším podílem falešně pozitivních případů.

Právě pro vyloučení možnosti, že by souhrnná detekce CRC markerů představovala příliš citlivou, avšak nedostatečně specifickou metodu pro screening CRC, jsme stanovili také odhad specifity k příslušným kategoriím skóre na základě míry falešné positivity. Vzhledem k omezené velikosti našeho souboru vzorků, který navíc nebyl vybírán z obecné populace je samozřejmě odhad těchto parametrů pouze orientační.

Na základě srovnání míry sensitivity ve srovnání s falešnou pozitivitou (poslední sloupec Tab. 22) odhadujeme, že optimální prahové skóre pro doporučení další verifikace rizika by se mohlo pohybovat mezi +0,5 až +1 (cca dva správně detekovaní CRC+ pacienti na cca jednoho falešně pozitivního). Sensitivita námi navrženého screeningu by se pak mohla pohybovat mezi 61 a 65 %, při falešné pozitivitě mezi 33 a 41 %. Sensitivita standardního FOBT testu v imunochemické modifikaci se přitom pohybuje mezi 71 a 80 %, při specifitě až 94 % (Hirai et al. 2016). Vzhledem k tomu, že v případě FOBT jde o výsledek dlouhodobého vývoje usilujícího o zvýšení sensitivity optimalizací detekčních metod a zvýšení specifity stanovením optimální prahové hodnoty detekce hemoglobinu ve stolici, nejde v našem případě vůbec o špatný výsledek, protože jde o první návrh na základě výsledků běžných detekčních metod provedených na relativně malém vzorku pacientů.

Možnosti dalšího zlepšení výsledků námi navrženého systému vidíme zejména v těchto oblastech:

1. Nové kultivační markery jsme detekovali běžnými kultivačními technikami, aniž bychom předem věděli, které druhy chceme specificky detekovat. Se znalostí nových markerů lze kultivační techniky optimalizovat a dosáhnout tak vyšší citlivosti jejich detekce.
2. Kromě kultivace lze pro detekci druhových markerů použít i pravděpodobně citlivější genetické techniky. Na rozdíl od necíleného sekvenování kompletního metagenomu většího vzorku stolice, které vyžaduje samoodběr podobně jako FOBT a vyžaduje nákladnější extrakci DNA, lze při cíleném zaměření na jednotlivé markerové druhy využít i snadno dostupný vzorek výtěru z konečníku. Totéž platí pro zaměření na detekci genů pro kolibaktin, CNF a hemolýzu.
3. Námi navržené schéma skórování hodnocení rizika lze dále optimalizovat na základě výsledků validace na větším vzorku obecné populace.
4. V neposlední řadě lze naše schéma rozšířit o další s vysokou pravděpodobností prokázané markery CRC, které lze pravděpodobně rovněž detekovat jednoduchou amplifikací z výtěru z konečníku (*Fusobacterium nucleatum*, BFT aj.).

## 6 ZÁVĚR

Role střevní mikrobioty je stále extenzivně studována pro svou dosud nedostatečně objasněnou funkci při rozvoji CRC. Procesy vedoucí k mutagenезi a následné karcinogenезi jsou v čím dál více publikacích spojovány s různými bakteriálními druhy a metabolickými produkty bakterií obývajících lidské střevo.

V této práci byl potvrzen signifikantní výskyt bakteriálních a genových markerů u CRC pacientů oproti kontrolám. Mezi druhové markery, které byly detekovány v signifikantní míře u CRC pacientů starších 50 let patří *C. perfringens* a *C. ramosum*. Druh *C. ramosum* doposud nebyl přímo spojován s CRC v žádné dostupné publikaci, jedná se tedy o první asociaci této bakterie s CRC, proto je nezbytné tento výsledek podpořit dalšími výzkumy. Mezi statisticky významné genové CRC markery kódující toxiny s již prokázanou pro-onkogenní aktivitou, patří gen kódující kolibaktin a CNF. Dále byla potvrzena asociace hemolytických kmenů *E. coli* s CRC

U výše zmíněných faktorů asociovaných s CRC bylo v této práci prokázáno zvýšení senzitivity a specifity detekce u CRC pacientů za použití výpočtu p hodnoty při jejich vzájemné kombinaci. Kultivační detekce, příp. PCR-detekce vybraných bakteriálních druhů kombinovaná s PCR genových markerů by mohla představovat finančně dostupnou, snadno proveditelnou a neinvazivní screeningovou metodu CRC, která by mohla zvýšit ochotu obecné populace k neinvazivnímu screeningu CRC a potenciálně zvýšit také senzitivitu již etablované detekce okultního krvácení ve stolici.

## 7 SUMMARY

The role of intestinal microbiota is being extensively studied because of its still not sufficiently elucidated function in the development of CRC. The processes leading to mutagenesis and subsequent carcinogenesis are increasingly associated with various bacterial species and metabolic products of bacteria that inhabit the human gut.

In this thesis, significant overrepresentation of some bacterial species and genes in CRC patients compared to controls was confirmed. Species markers that have been linked to CRC in patients older than 50 years included *C. perfringens*, *B. fragilis* and *C. ramosum*. To our best knowledge, *C. ramosum* has not been directly associated with CRC so far. Genes confirmed to be significantly associated with CRC included those coding for toxins already known for their pro-oncogenic activity, namely colibactin and CNF. Furthermore, hemolytic *E. coli* was linked to CRC as well.

Because most of the markers appeared independently from each other in the study participants, it should be possible to increase the sensitivity and specificity of a screening scheme when based on combined presence of more than one marker. Internal validation of an outlined CRC risk scoring scheme confirmed this idea. To conclude, simple culture detection and/or targeted PCR-detection of appropriate bacterial species and toxin genes should represent an affordable, easy-to-perform and non-invasive CRC screening technique that may further increase specificity and sensitivity of the well-established FOBT, as well as the adherence of general population to non-invasive CRC screening.

## 8 SEZNAM LITERATURY

- Abed, Jawad, Johanna E.M. Emgård, Gideon Zamir, Mouhammad Faroja, Gideon Almogy, Amalie Grenov, Asaf Sol, et al. 2016. “Fap2 Mediates Fusobacterium Nucleatum Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc.” *Cell Host and Microbe* 20 (2): 215–25. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.006>.
- Aghabozorgi, Amirsaeed Sabeti, Reyhane Ebrahimi, Alireza Bahirae, Sadra Samavarchi Tehrani, Fatemeh Nabizadeh, Leila Setayesh, Reza Jafarzadeh-Esfehani, Gordon A. Ferns, Amir Avan, and Zahra Rashidi. 2020. “The Genetic Factors Associated with Wnt Signaling Pathway in Colorectal Cancer.” *Life Sciences* 256 (June): 118006. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118006>.
- Ai, Dongmei, Hongfei Pan, Rongbao Han, Xiaoxin Li, Gang Liu, and Li C. Xia. 2019. “Using Decision Tree Aggregation with Random Forest Model to Identify Gut Microbes Associated with Colorectal Cancer.” *Genes* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/genes10020112>.
- Al-Zubaidi, Sara K. 2019. “Detection of Cytolysis Peptide Toxin Gene (Candidalysin) in Candida Albicans Isolates.” *Indian Journal of Public Health Research and Development* 10 (10): 2159–62. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2019.03172.3>.
- Allen, Jawara, Stephanie Hao, Cynthia L. Sears, and Winston Timp. 2019. “Epigenetic Changes Induced by Bacteroides Fragilis Toxin.” *Infection and Immunity* 87 (6): 1–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.00447-18>.
- Alonso, Pilar, Jorge Blanco, Miguel Blanco, and Enrique A. Gonzalez. 1987. “Frequent Production of Toxins by Escherichia Coli Strains Isolated from Human Urinary Tract Infections: Relation with Haemagglutination.” *FEMS Microbiology Letters* 48 (3): 391–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02630.x>.
- Arthur, Janelle C., Raad Z. Gharaibeh, Mühlbauer Marcus, Perez- Chanona Ernesto, Joshua M. Uronis, Jonathan McCafferty, Anthony A. Fodor, and Christian Jobin. 2015. “Microbial Genomic Analysis Reveals the Essential Role of Inflammation in Bacteria-Induced Colorectal Cancer.” *Nature Communications* 344 (6188): 1173–78. <https://doi.org/10.1126/science.1249098.Sleep>.

- Bao, Yujie, Jiayin Tang, Yun Qian, Tiantian Sun, Huimin Chen, Zhaofei Chen, Danfeng Sun, et al. 2019. "Long Noncoding RNA BFAL1 Mediates Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis-Related Carcinogenesis in Colorectal Cancer via the RHEB/MTOR Pathway." *Cell Death and Disease* 10 (9). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1925-2>.
- Baxter, Nielson T., Mack T. Ruffin, Mary A.M. Rogers, and Patrick D. Schloss. 2016. "Microbiota-Based Model Improves the Sensitivity of Fecal Immunochemical Test for Detecting Colonic Lesions." *Genome Medicine* 8 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0290-3>.
- Bisicchia, R., R. Ciammarughi, A. Caprioli, V. Falbo, and F. M. Ruggeri. 1985. "Toxin Production and Haemagglutination in Strains of Escherichia Coli from Diarrhoea in Brescia, Italy." *Journal of Hygiene* 95 (2): 353–61. <https://doi.org/10.1017/S002217240006277X>.
- Boleij, Annemarie, Elizabeth M Hechenbleikner, Andrew C Goodwin, Ruchi Badani, Ellen M Stein, Mark G Lazarev, Brandon Ellis, et al. 2015. "The Bacteroides Fragilis Toxin Gene Is Prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 60 (2): 208–15. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu787>.
- Bonnet, Mathilde, Emmanuel Buc, Pierre Sauvanet, Claude Darcha, Damien Dubois, Bruno Pereira, Pierre Déchelotte, Richard Bonnet, Denis Pezet, and Arlette Darfeuille-Michaud. 2014. "Colonization of the Human Gut by E. Coli and Colorectal Cancer Risk." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (4): 859–67. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1343>.
- Bossuet-Greif, Nadège, Damien Dubois, Claude Petit, Sophie Tronnet, Patricia Martin, Richard Bonnet, Eric Oswald, and Jean Philippe Nougayrède. 2016. "Escherichia ColiClbS Is a Colibactin Resistance Protein." *Molecular Microbiology* 99 (5): 897–908. <https://doi.org/10.1111/mmi.13272>.
- Bouzari, Saeid, Mana Oloomi, and Eric Oswald. 2005. "Detection of the Cytolethal Distending Toxin Locus CdtB among Diarrheagenic Escherichia Coli Isolates from



- Humans in Iran.” *Research in Microbiology* 156 (2): 137–44. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.011>.
- Buc, Emmanuel, Damien Dubois, Pierre Sauvanet, Jennifer Raisch, Julien Delmas, Arlette Darfeuille-Michaud, Denis Pezet, and Richard Bonnet. 2013. “High Prevalence of Mucosa-Associated E. Coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer.” *PLoS ONE* 8 (2): e56964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056964>.
- Buetow, Lori, Gilles Flatau, Katy Chiu, Patrice Boquet, and Partho Ghosh. 2001. “Structure of the Rho-Activating Domain of Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1.” *Nature Structural Biology* 8 (7): 584–88. <https://doi.org/10.1038/89610>.
- Candela, Marco, Silvia Turrone, Elena Biagi, Franck Carbonero, Simone Rampelli, Carla Fiorentini, and Patrizia Brigidi. 2014. “Inflammation and Colorectal Cancer, When Microbiota-Host Mutualism Breaks.” *World Journal of Gastroenterology* 20 (4): 908–22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.908>.
- Caprioli, A., V. Falbo, L. G. Roda, F. M. Ruggeri, and C. Zona. 1983. “Partial Purification and Characterization of an Escherichia Coli Toxic Factor That Induces Morphological Cell Alterations.” *Infection and Immunity* 39 (3): 1300–1306.
- Carroll, Ian M., Jason M. Andrus, José M. Bruno-Bárcena, Todd R. Klaenhammer, Hosni M. Hassan, and Deborah S. Threadgill. 2007. “Anti-Inflammatory Properties of Lactobacillus Gasseri Expressing Manganese Superoxide Dismutase Using the Interleukin 10-Deficient Mouse Model of Colitis.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (4): 729–38. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00132.2007>.
- Chakvetadze, Catherine, Anastasia Purcarea, Aurelia Pitsch, Jonathan Chelly, and Sylvain Diamantis. 2017. “Detection of Fusobacterium Nucleatum in Culture-Negative Brain Abscess by Broad-Spectrum Bacterial 16S rRNA Gene PCR.” *IDCases* 8 (April): 94–95. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.04.013>.
- Chen, Danfeng, Duochen Jin, Shumin Huang, Jingyi Wu, Mengque Xu, Tianyu Liu, Wenxiao Dong, et al. 2020. “Clostridium Butyricum, a Butyrate-Producing Probiotic, Inhibits Intestinal Tumor Development through Modulating Wnt

- Signaling and Gut Microbiota.” *Cancer Letters* 469 (154): 456–67. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.019>.
- Chen, Hui-Min, Ya-Nan Yu, Ji-Lin Wang, Yan-Wei Lin, Xuan Kong, Chang-Qing Yang, Li Yang, et al. 2013. “Decreased Dietary Fiber Intake and Structural Alteration of Gut Microbiota in Patients with Advanced Colorectal Adenoma.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 97 (5): 1044–52. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.046607>.
- Chen, Hui Min, Ya Nan Yu, Ji Lin Wang, Yan Wei Lin, Xuan Kong, Chang Qing Yang, Li Yang, et al. 2013. “Decreased Dietary Fiber Intake and Structural Alteration of Gut Microbiota in Patients with Advanced Colorectal Adenoma.” *American Journal of Clinical Nutrition* 97 (5): 1044–52. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.046607>.
- Chung, Gyung Tae, Augusto A. Franco, Shaoguang Wu, Gi Eun Rhie, Rodney Cheng, Hee Bok Oh, and Cynthia L. Sears. 1999. “Identification of a Third Metalloprotease Toxin Gene in Extraintestinal Isolates of *Bacteroides Fragilis*.” *Infection and Immunity* 67 (9): 4945–49. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4945-4949.1999>.
- Chung, Liam, Erik Thiele Orberg, Abby L. Geis, June L. Chan, Kai Fu, Christina E. De Stefano Shields, Christine M. Dejea, Payam Fathi, Jie Chen, Benjamin B. Finard, Ada J. Tam, Florencia M. McAllister, et al. 2018. “*Bacteroides Fragilis* Toxin Coordinates a Pro-Carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells.” *Cell Host and Microbe* 23: 203–14. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.007>.
- Chung, Liam, Erik Thiele Orberg, Abby L Geis, June L Chan, Kai Fu, Christina E Destefano Shields, Christine M Dejea, Payam Fathi, Jie Chen, B Finard, Ada J Tam, Florencia M Mcallister, et al. 2018. “*Bacteroides Fragilis* Toxin Coordinates a Pro-Carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells.” *Cell Host Microbe* 23 (2): 203–14. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.007>.
- Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. “Rapid and Simple Determination of the *Escherichia Coli* Phylogenetic Group.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (10): 4555–58. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.

- Compare, Debora, and Gerardo Nardone. 2014. "The Bacteria-Hypothesis of Colorectal Cancer : Pathogenetic and Therapeutic Implications." *Transl Gastrointest Cancer* 3 (1): 44–53. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4778.2013.05.37>.
- Cuevas-Ramos, Gabriel, Claude R. Petit, Ingrid Marcq, Michèle Boury, Eric Oswald, and Jean Philippe Nougayrède. 2010. "Escherichia Coli Induces DNA Damage in Vivo and Triggers Genomic Instability in Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25): 11537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001261107>.
- Dejea, Christine M., Payam Fathi, John M. Craig, Annemarie Boleij, Rahwa Taddese, Abby L. Geis, Xinqun Wu, et al. 2018. "Patients with Familial Adenomatous Polyposis Harbor Colonic Biofilms Containing Tumorigenic Bacteria." *Science* 359 (6375): 592–97. <https://doi.org/10.1126/science.aah3648>.
- Di, Ziyang, Maojun Di, Weihua Fu, Qiang Tang, Yanwei Liu, Peijie Lei, Xinsheng Gu, Tong Liu, and Min Sun. 2020. "Integrated Analysis Identifies a Nine-MicroRNA Signature Biomarker for Diagnosis and Prognosis in Colorectal Cancer." *Frontiers in Genetics* 11 (March): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00192>.
- Dziubańska-Kusibab, Paulina J., Hilmar Berger, Federica Battistini, Britta A.M. Bouwman, Amina Iftexhar, Riku Katainen, Tatiana Cajuso, et al. 2020. "Colibactin DNA-Damage Signature Indicates Mutational Impact in Colorectal Cancer." *Nature Medicine* 26 (7): 1063–69. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0908-2>.
- Ekobom, A., H. O. Adami, C. Helmick, and M. Zack. 1990. "Increased Risk of Large-Bowel Cancer in Crohn's Disease with Colonic Involvement." *The Lancet* 336 (8711): 357–59. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91889-I](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91889-I).
- Elangovan, Indira M., Michelle Vaz, Chandramohan R. Tamatam, Haranatha R. Potteti, Narsa M. Reddy, and Sekhar P. Reddy. 2018. "FOSL1 Promotes Kras-Induced Lung Cancer through Amphiregulin and Cell Survival Gene Regulation." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 58 (5): 625–35. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0164OC>.
- Elwell, Cherilyn A., and Lawrence A. Dreyfus. 2000. "DNase I Homologous Residues in CdtB Are Critical for Cytotoxic Distending Toxin-Mediated Cell Cycle Arrest."

- Molecular Microbiology* 37 (4): 952–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02070.x>.
- Fabian, Niora J., Anthony J. Mannion, Yan Feng, Carolyn M. Madden, and James G. Fox. 2020. “Intestinal Colonization of Genotoxic Escherichia Coli Strains Encoding Colibactin and Cytotoxic Necrotizing Factor in Small Mammal Pets.” *Veterinary Microbiology* 240 (March 2019): 108506. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108506>.
- Fahrer, Jörg, Johannes Huelsenbeck, Henriette Jaurich, Bastian Dörsam, Teresa Frisan, Marcus Eich, Wynand P. Roos, Bernd Kaina, and Gerhard Fritz. 2014. “Cytotolethal Distending Toxin (CDT) Is a Radiomimetic Agent and Induces Persistent Levels of DNA Double-Strand Breaks in Human Fibroblasts.” *DNA Repair* 18 (1): 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.002>.
- Falbo, V., M. Famiglietti, and A. Caprioli. 1992. “Gene Block Encoding Production of Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin in Escherichia Coli Isolates from Extraintestinal Infections.” *Infection and Immunity* 60 (6): 2182–87.
- Fantini, Massimo Claudio, and Ilaria Guadagni. 2021. “From Inflammation to Colitis-Associated Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis and Impact of Current Therapies.” *Digestive and Liver Disease*, no. xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2021.01.012>.
- Fedor, Y., J. Vignard, M. L. Nicolau-Travers, E. Boutet-Robinet, C. Watrin, B. Salles, and G. Mirey. 2013. “From Single-Strand Breaks to Double-Strand Breaks during S-Phase: A New Mode of Action of the Escherichia Coli Cytotolethal Distending Toxin.” *Cellular Microbiology* 15 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1111/cmi.12028>.
- Feng, Qiang, Suisha Liang, Huijue Jia, Andreas Stadlmayr, Longqing Tang, Zhou Lan, Dongya Zhang, et al. 2015. “Gut Microbiome Development along the Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence.” *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7528>.
- Fiorentini, C., L. Falzano, A. Fabbri, A. Stringaro, M. Logozzi, S. Travaglione, S. Contamin, G. Arancia, W. Malorni, and S. Fais. 2001. “Activation of Rho GTPases by Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Induces Macropinocytosis and Scavenging

- Activity in Epithelial Cells.” *Molecular Biology of the Cell* 12 (7): 2061–73.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.12.7.2061>.
- Fiorentini, Carla, Alessia Fabbri, Gilles Flatau, Gianfranco Donelli, Paola Matarrese, Emmanuel Lemichez, Loredana Falzano, and Patrice Boquet. 1997. “Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1), a Toxin That Activates the Rho GTPase.” *Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19532–37.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19532>.
- Fiorentini, Carla, Paola Matarrese, Elisabetta Straface, Loredana Falzano, Gianfranco Donelli, Patrice Boquet, and Walter Malorni. 1998. “Rho-Dependent Cell Spreading Activated by E.Coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Hinders Apoptosis in Epithelial Cells.” *Cell Death and Differentiation* 5 (11): 921–29.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400422>.
- Flatau, Gilles, Emmanuel Lemichez, Michel Gauthier, Pierre Chardin, Sonia Paris, Carla Fiorentini, and Patrice Boquet. 1997. “Toxin-Induced Activation of the G Protein P21 Rho by Deamidation of Glutamine.” *Nature* 387 (6634): 729–33.  
<https://doi.org/10.1038/42743>.
- Franco, Augusto A., Linda M. Mundy, Michele Trucksis, Shaoguang Wu, James B. Kaper, and Cynthia L. Sears. 1997. “Cloning and Characterization of the Bacteroides Fragilis Metalloprotease Toxin Gene.” *Infection and Immunity* 65 (3): 1007–13.  
<https://doi.org/10.1128/iai.65.3.1007-1013.1997>.
- Frisan, Teresa, Ximena Cortes-Bratti, and Monica Thelestam. 2001. “Cytotoxic Distending Toxins and Activation of DNA Damage-Dependent Checkpoint Responses.” *International Journal of Medical Microbiology* 291 (6–7): 495–99.  
<https://doi.org/10.1078/1438-4221-00158>.
- Gagnière, Johan, Virginie Bonnin, Anne Sophie Jarrousse, Emilie Cardamone, Allison Agus, Nancy Uhrhammer, Pierre Sauvanet, et al. 2017. “Interactions between Microsatellite Instability and Human Gut Colonization by Escherichia Coli in Colorectal Cancer.” *Clinical Science* 131 (6): 471–85.  
<https://doi.org/10.1042/CS20160876>.
- Garcia, Jorge P., Jihong Li, Archana Shrestha, John C. Freedman, Juliann Beingesser,

- Bruce A. McClane, and Francisco A. Uzal. 2014. "Clostridium Perfringens Type A Enterotoxin Damages the Rabbit Colon." *Infection and Immunity* 82 (6): 2211–18. <https://doi.org/10.1128/IAI.01659-14>.
- Ge, Zhongming, Arlin B. Rogers, Yan Feng, Amy Lee, Shilu Xu, Nancy S. Taylor, and James G. Fox. 2007. "Bacterial Cytolethal Distending Toxin Promotes the Development of Dysplasia in a Model of Microbially Induced Hepatocarcinogenesis." *Cellular Microbiology* 9 (8): 2070–80. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00939.x>.
- Gerhard, Ralf, Gudula Schmidt, Fred Hofmann, and Klaus Aktories. 1998. "Activation of Rho GTPases by Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Increases Intestinal Permeability in Caco-2 Cells." *Infection and Immunity* 66 (11): 5125–31. <https://doi.org/10.1128/iai.66.11.5125-5131.1998>.
- Glatthardt, Thaís, Juliana Curityba de Mello Campos, Raiane Cardoso Chamon, Thiago Freitas de Sá Coimbra, Giulia de Almeida Rocha, Marília Alves Figueira de Melo, Thiago Estevam Parente, et al. 2020. "Small Molecules Produced by Commensal Staphylococcus." *Applied and Environmental Microbiology* 86 (5): 02539–19.
- Grailot, Vanessa, Inge Dormoy, Jacques Dupuy, Jerry W. Shay, Laurence Huc, Gladys Mirey, and Julien Vignard. 2016. "Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (MAR): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00034>.
- Grasso, Francesca, and Teresa Frisan. 2015. "Bacterial Genotoxins: Merging the DNA Damage Response into Infection Biology." *Biomolecules* 5 (3): 1762–82. <https://doi.org/10.3390/biom5031762>.
- Guntaka, Naga Sandhya, Alan R Healy, Jason M Crawford, Seth B Herzon, and Steven D Bruner. 2016. "Structure and Functional Analysis of ClbQ, an Unusual Intermediate-Releasing Thioesterase from the Colibactin Biosynthetic Pathway Naga." *Physiology & Behavior* 176 (1): 100–106. <https://doi.org/10.1021/acschem-bio.7b00479>. Primers.
- Guo, Pin, Zibin Tian, Xinjuan Kong, Lin Yang, Xinzhi Shan, Bingzi Dong, Xueli Ding,

- et al. 2020. “FadA Promotes DNA Damage and Progression of *Fusobacterium Nucleatum*-Induced Colorectal Cancer through up-Regulation of Chk2.” *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 39 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01677-w>.
- Gur, Chamutal, Yara Ibrahim, Batya Isaacson, Rachel Yamin, Jawad Abed, Moriya Gamliel, Jonatan Enk, et al. 2015. “Binding of the Fap2 Protein of *Fusobacterium Nucleatum* to Human Inhibitory Receptor TIGIT Protects Tumors from Immune Cell Attack.” *Immunity* 42 (2): 344–55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.010>.
- Haghi, Fakhri, Elshan Goli, Bahman Mirzaei, and Habib Zeighami. 2019. “The Association between Fecal Enterotoxigenic *B. Fragilis* with Colorectal Cancer.” *BMC Cancer* 19 (1): 879. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6115-1>.
- Hannigan, Geoffrey D., Melissa B. Duhaime, Mack T. Ruffin, Charlie C. Koumpouras, and Patrick D. Schloss. 2017. “The Diagnostic Potential & Interactive Dynamics of the Colorectal Cancer Virome.” *BioRxiv* 9 (6): 1–13. <https://doi.org/10.1101/152868>.
- Hassane, Duane C., Robert B. Lee, and Carol L. Pickett. 2003. “*Campylobacter Jejuni* Cytolethal Distending Toxin Promotes DNA Repair Responses in Normal Human Cells.” *Infection and Immunity* 71 (1): 541–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.541-545.2003>.
- He, Zhen, Raad Z. Gharaibeh, Rachel C. Newsome, Jllian L. Pope, Michael W. Dougherty, Sarah Tomkovich, Benoit Pons, et al. 2019. “*Campylobacter Jejuni* Promotes Colorectal Tumorigenesis through the Action of Cytolethal Distending Toxin.” *Gut* 68 (2): 289–300. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317200>.
- Hernandez-luna, Marco Antonio, and Hugo Enrique Lagunes-servin. 2017. “The Role of *Escherichia Coli* in the Development and Progression of Cancer.” *ARC Journal of Cancer Science* 3 (1). <https://doi.org/10.20431/2455-6009.0301001>.
- Hilali, Farida, Raymond Ruimy, Patrick Saulnier, Christian Barnabé, Chantal Lebouguéne, Michel Tibayrenc, and Antoine Andremont. 2000. “Prevalence of Virulence Genes and Clonality in *Escherichia Coli* Strains That Cause Bacteremia

- in Cancer Patients.” *Infection and Immunity* 68 (7): 3983–89. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.3983-3989.2000>.
- Hirai, H. W., K. K.F. Tsoi, J. Y.C. Chan, S. H. Wong, J. Y.L. Ching, M. C.S. Wong, J. C.Y. Wu, F. K.L. Chan, J. J.Y. Sung, and S. C. Ng. 2016. “Systematic Review with Meta-Analysis: Faecal Occult Blood Tests Show Lower Colorectal Cancer Detection Rates in the Proximal Colon in Colonoscopy-Verified Diagnostic Studies.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 43 (7): 755–64. <https://doi.org/10.1111/apt.13556>.
- Homburg, Stefan, Eric Oswald, Jörg Hacker, and Ulrich Dobrindt. 2007. “Expression Analysis of the Colibactin Gene Cluster Coding for a Novel Polyketide in *Escherichia Coli*.” *FEMS Microbiology Letters* 275 (2): 255–62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00889.x>.
- Hsu, Yun, Gregory Jubelin, Frédéric Taieb, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald, and C. Erec Stebbins. 2008. “Structure of the Cyclomodulin Cif from Pathogenic *Escherichia Coli*.” *Journal of Molecular Biology* 384 (2): 465–77. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.051>.
- Iftekhar, Amina, Hilmar Berger, Nassim Bouznad, Julian Heuberger, Francesco Boccellato, Ulrich Dobrindt, Heiko Hermeking, Michael Sigal, and Thomas F. Meyer. 2021. “Genomic Aberrations after Short-Term Exposure to Colibactin-Producing *E. Coli* Transform Primary Colon Epithelial Cells.” *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21162-y>.
- Imhann, Floris, Arnau Vich Vila, Marc Jan Bonder, Jingyuan Fu, Dirk Gevers, Marijn C. Visschedijk, Lieke M. Spekhorst, et al. 2018. “Interplay of Host Genetics and Gut Microbiota Underlying the Onset and Clinical Presentation of Inflammatory Bowel Disease.” *Gut* 67 (1): 108–19. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312135>.
- Iyadorai, Thevambiga, Vanitha Mariappan, Kumutha Malar Vellasamy, Jane Wangui Wanyiri, April Camilla Roslani, Goh Khean Lee, Cynthia Sears, and Jamuna Vadivelu. 2020. “Prevalence and Association of Pks+ *Escherichia Coli* with Colorectal Cancer in Patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia.” *PLoS ONE* 15 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228217>.



- Jiang, Haiye, Jian Li, Bin Zhang, Rong Huang, Junhua Zhang, Ziwei Chen, Xueling Shang, Xisheng Li, and Xinmin Nie. 2019. "Intestinal Flora Disruption and Novel Biomarkers Associated With Nasopharyngeal Carcinoma." *Frontiers in Oncology* 9 (December): 1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01346>.
- Jinadasa, Rasika N, Stephen E Bloom, Robert S Weiss, and Gerald E Duhamel. 2011. "Cytotolethal Distending Toxin: A Conserved Bacterial Genotoxin That Blocks Cell Cycle Progression, Leading to Apoptosis of a Broad Range of Mammalian Cell Lineages." *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 7): 1851–75. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049536-0>.
- Johnson, James R., Brian Johnston, Michael A. Kuskowski, Jean Philippe Nougayrede, and Eric Oswald. 2008. "Molecular Epidemiology and Phylogenetic Distribution of the Escherichia Coli Pks Genomic Island." *Journal of Clinical Microbiology* 46 (12): 3906–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.00949-08>.
- Johnson, W. M., and H. Lior. 1988. "A New Heat-Labile Cytotolethal Distending Toxin (CLDT) Produced by Campylobacter Spp." *Microbial Pathogenesis* 4 (2): 115–26. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(88\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0882-4010(88)90053-8).
- Kasper, Lydia, Annika König, Paul Albert Koenig, Mark S. Gresnigt, Johannes Westman, Rebecca A. Drummond, Michail S. Lionakis, et al. 2018. "The Fungal Peptide Toxin Candidalysin Activates the NLRP3 Inflammasome and Causes Cytolysis in Mononuclear Phagocytes." *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06607-1>.
- Kawasaki, Yasuhiko, Zheng-Zhong Xu, Xiaoying Wang, Jong-Yeon Park, Zhie-Ye Zhuang, Ping-Heng Tan, Yong-Jing Gao, et al. 2008. "Distinct Roles of Matrix Metalloproteases in the Early- and Late- Phase Development of Neuropathic Pain." *Nature Medicine* 23 (1): 1–7.
- Knust, Zeynep, Britta Blumenthal, Klaus Aktories, and Gudula Schmidt. 2009. "Cleavage of Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Is Required for Full Biologic Activity." *Infection and Immunity* 77 (5): 1835–41. <https://doi.org/10.1128/IAI.01145-08>.
- Kostic, Aleksandar D., Eunyoung Chun, Lauren Robertson, Jonathan N. Glickman, Carey

- Ann Gallini, Monia Michaud, Thomas E. Clancy, et al. 2013. "Fusobacterium Nucleatum Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment." *Cell Host and Microbe* 14 (2): 207–15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>.
- Kurnick, Susanna A., Anthony J. Mannion, Yan Feng, Carolyn M. Madden, Paul Chamberlain, and James G. Fox. 2019. "Genotoxic Escherichia Coli Strains Encoding Colibactin, Cytolethal Distending Toxin, and Cytotoxic Necrotizing Factor in Laboratory Rats." *Comparative Medicine* 69 (2): 103–13. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000099>.
- Kwong, Thomas N.Y., Xiansong Wang, Geicho Nakatsu, Tai Cheong Chow, Timothy Tipoe, Rudin Z.W. Dai, Kelvin K.K. Tsoi, et al. 2018. "Association Between Bacteremia From Specific Microbes and Subsequent Diagnosis of Colorectal Cancer." *Gastroenterology* 155 (2): 383-390.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.028>.
- Lacerda, Hadriano M., Gill D. Pullinger, Alistair J. Lax, and Enrique Rozengurt. 1997. "Cytotoxic Necrotizing Factor 1 from Escherichia Coli and Dermonecrotic Toxin from Bordetella Bronchiseptica Induce P21(Rho)-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase and Paxillin in Swiss 3T3 Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9587–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9587>.
- Langholz, Ebbe, Pia Munkholm, Michael Davidsen, and Vibeke Binder. 1992. "Colorectal Cancer Risk and Mortality in Patients with Ulcerative Colitis." *Gastroenterology* 103 (5): 1444–51. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91163-X](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91163-X).
- Lax, Alistair J., and Warren Thomas. 2002. "How Bacteria Could Cause Cancer: One Step at a Time." *Trends in Microbiology* 10 (6): 293–99. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02360-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02360-0).
- Lemichez, Emmanuel, Gilles Flatau, Marc Bruzzone, Patrice Boquet, and Michel Gauthier. 1997. "Molecular Localization of the Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor CNF1 Cell-Binding and Catalytic Domains." *Molecular*

- Microbiology* 24 (5): 1061–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4151781.x>.
- Li, Li Qi, Anatoly Sharipo, Esteban Chaves-Olarte, Maria G. Masucci, Victor Levitsky, Monica Thelestam, and Teresa Frisan. 2002. “The Haemophilus Ducreyi Cytolethal Distending Toxin Activates Sensors of DNA Damage and Repair Complexes in Proliferating and Non-Proliferating Cells.” *Cellular Microbiology* 4 (2): 87–99. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00174.x>.
- Li, Zhong-Rui, Jie Li, Wenlong Cai, Jennifer Y. H. Lai, Shaun M. K. McKinnie, Wei-Peng Zhang, Bradley S. Moore, Wenjun Zhang, and Pei-Yuan Qian. 2019. “Macrocyclic Colibactin Induces DNA Double-Strand Breaks via Copper-Mediated Oxidative Cleavage.” *Nature Chemistry* 11 (10): 880–89. <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0317-7>.
- Luo, Y. Z., P. He, and M. X. Qiu. 2018. “FOSL1 Enhances Growth and Metastasis of Human Prostate Cancer Cells through Epithelial Mesenchymal Transition Pathway.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22 (24): 8609–15. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201812\\_16624](https://doi.org/10.26355/eurrev_201812_16624).
- Madico, G., N. S. Akopyants, and D. E. Berg. 1995. “Arbitrarily Primed PCR DNA Fingerprinting of Escherichia Coli O157:H7 Strains by Using Templates from Boiled Cultures.” *Journal of Clinical Microbiology* 33 (6): 1534–36. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.6.1534-1536.1995>.
- Magni, Martina, Vincenzo Ruscica, Giacomo Buscemi, Ja Eun Kim, Benjamin Tamilselvan Nachimuthu, Enrico Fontanella, Domenico Delia, and Laura Zannini. 2014. “Chk2 and REGγ-Dependent DBC1 Regulation in DNA Damage Induced Apoptosis.” *Nucleic Acids Research* 42 (21): 13150–60. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1065>.
- Mahenthalingam, Eshwar, Maureen E. Campbell, Jennifer Foster, Joseph S. Lam, and David P. Speert. 1996. “Random Amplified Polymorphic DNA Typing of Pseudomonas Aeruginosa Isolates Recovered from Patients with Cystic Fibrosis.” *Journal of Clinical Microbiology* 34 (5): 1129–35. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1129-1135.1996>.

- Mandić, Ana D., Anni Woting, Tina Jaenicke, Anika Sander, Wiebke Sabrowski, Ulrike Rolle-Kampczyk, Martin von Bergen, and Michael Blaut. 2019. "Clostridium Ramosum Regulates Enterochromaffin Cell Development and Serotonin Release." *Scientific Reports* 9 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38018-z>.
- Mangifesta, Marta, Leonardo Mancabelli, Christian Milani, Federica Gaiani, Nicola de' Angelis, Gian Luigi de' Angelis, Douwe van Sinderen, Marco Ventura, and Francesca Turroni. 2018. "Mucosal Microbiota of Intestinal Polyps Reveals Putative Biomarkers of Colorectal Cancer." *Scientific Reports* 8 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32413-2>.
- Marchès, Olivier, Terence Neil Ledger, Michèle Boury, Masaru Ohara, Xuanlin Tu, Frédéric Goffaux, Jacques Mainil, et al. 2003. "Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic Escherichia Coli Deliver a Novel Effector Called Cif, Which Blocks Cell Cycle G2/M Transition." *Molecular Microbiology* 50 (5): 1553–67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03821.x>.
- Martin-Gallausiaux, Camille, Antoine Malabirade, Janine Habier, and Paul Wilmes. 2020. "Fusobacterium Nucleatum Extracellular Vesicles Modulate Gut Epithelial Cell Innate Immunity via FomA and TLR2." *Frontiers in Immunology* 11 (December): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583644>.
- May, Martin, Tanja Kolbe, Tianbang Wang, Gudula Schmidt, and Harald Genth. 2012. "Increased Cell-Matrix Adhesion upon Constitutive Activation of Rho Proteins by Cytotoxic Necrotizing Factors from E. Coli and Y. Pseudotuberculosis ." *Journal of Signal Transduction* 2012: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/570183>.
- Moncrief, J. S., A. J. Duncan, R. L. Wright, L. A. Barroso, and T. D. Wilkins. 1998. "Molecular Characterization of the Fragilysin Pathogenicity Islet of Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis." *Infection and Immunity* 66 (4): 1735–39. <https://doi.org/10.1128/iai.66.4.1735-1739.1998>.
- Moncrief, J. S., R. Obiso, L. A. Barroso, J. J. Kling, R. L. Wright, R. L. Van Tassell, D. M. Lyerly, and T. D. Wilkins. 1995. "The Enterotoxin of Bacteroides Fragilis Is a Metalloprotease." *Infection and Immunity* 63 (1): 175–81. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.175-181.1995>.

- Morgan, Radwa N., Sarra E. Saleh, Hala A. Farrag, and Mohammad M. Aboulwafa. 2019. "Prevalence and Pathologic Effects of Colibactin and Cytotoxic Necrotizing Factor-1 (Cnf 1) in Escherichia Coli: Experimental and Bioinformatics Analyses." *Gut Pathogens* 11 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0304-y>.
- Moyes, David L., Duncan Wilson, Jonathan P. Richardson, Selene Mogavero, Shirley X. Tang, Julia Wernecke, Sarah Höfs, et al. 2016. "Candidalysin Is a Fungal Peptide Toxin Critical for Mucosal Infection." *Nature*, March. <https://doi.org/10.1038/nature17625>.
- Munkholm, Pia. 2003. "Review Article: The Incidence and Prevalence of Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement* 18 (2): 1–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x>.
- Muzny, Donna M., Matthew N. Bainbridge, Kyle Chang, Huyen H. Dinh, Jennifer A. Drummond, Gerald Fowler, Christie L. Kovar, et al. 2012. "Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer." *Nature* 487 (7407): 330–37. <https://doi.org/10.1038/nature11252>.
- Naik, Shruti, Nicolas Bouladoux, Christoph Wilhelm, Michael J. Molloy, Rosalba Salcedo, Wolfgang Kastentmuller Clayton Deming, Dzutsev Mariam, et al. 2012. "Recognition of Peptidoglycan from the Microbiota by Nod1 Enhances Systemic Innate Immunity." *Nature Medicine* 16 (2): 228–31. <https://doi.org/10.1038/nm.2087>.
- Nasrullah Satiman, Engku Anis Fariha Engku, Hasna Ahmad, Ahmad Bazli Ramzi, Ridhwan Abdul Wahab, Mohd Arifin Kaderi, Wan Himratul Aznita Wan Harun, Stuart Dashper, Michael McCullough, and Mohd Hafiz Arzmi. 2020. "The Role of Candida Albicans Candidalysin ECE1 Gene in Oral Carcinogenesis ." *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 0–3. <https://doi.org/10.1111/jop.13014>.
- Nešić, Dragana, Yun Hsu, and C. Erec Stebbins. 2004. "Assembly and Function of a Bacterial Genotoxin." *Nature* 429 (6990): 429–33. <https://doi.org/10.1038/nature02532>.
- Nobes, Catherine D., and Alan Hall. 1995. "Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the

- Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia.” *Cell* 81 (1): 53–62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4).
- Nørgaard, Mette, Reimar Wernich Thomsen, Dora Körmendiné Farkas, Mads Filtenborg Mogensen, and Henrik Toft Sørensen. 2013. “Candida Infection and Cancer Risk: A Danish Nationwide Cohort Study.” *European Journal of Internal Medicine* 24 (5): 451–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.02.017>.
- Nougayrede, J.-P. 2006. “Escherichia Coli Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells.” *Science* 313 (5788): 848–51. <https://doi.org/10.1126/science.1127059>.
- Nougayrède, J. P., M. Boury, C. Tasca, O. Marchès, A. Milon, E. Oswald, and J. De Rycke. 2001. “Type III Secretion-Dependent Cell Cycle Block Caused in HeLa Cells by Enteropathogenic Escherichia Coli O103.” *Infection and Immunity* 69 (11): 6785–95. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6785-6795.2001>.
- Nougayrède, Jean Philippe, Olivier Marchès, Michèle Boury, Jacques Mainil, Gérard Charlier, Pierre Pohl, Jean De Rycke, Alain Milon, and Eric Oswald. 1999. “The Long-Term Cytoskeletal Rearrangement Induced by Rabbit Enteropathogenic Escherichia Coli Is Esp Dependent but Intimin Independent.” *Molecular Microbiology* 31 (1): 19–30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01138.x>.
- Odamaki, Toshitaka, Hirosuke Sugahara, Sumiko Yonezawa, Tomoko Yaeshima, Keiji Iwatsuki, Soichi Tanabe, Tomoya Tominaga, Hideo Togashi, Yoshimi Benno, and Jin zhong Xiao. 2012. “Effect of the Oral Intake of Yogurt Containing Bifidobacterium Longum BB536 on the Cell Numbers of Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis in Microbiota.” *Anaerobe* 18 (1): 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.004>.
- Ogbu, Chinemerem P., Sourav Roy, and Alex J. Vecchio. 2022. “Disruption of Claudin-Made Tight Junction Barriers by Clostridium Perfringens Enterotoxin : Insights from Structural Biology.” *Cells* 11 (5): 903.
- Oka, Kazuhito, Toshiki Tanaka, Tadahiko Enoki, Koichi Yoshimura, Mako Ohshima, Masayuki Kubo, Tomoyuki Murakami, et al. 2010. “DNA Damage Signaling Is

- Activated during Cancer Progression in Human Colorectal Carcinoma.” *Cancer Biology and Therapy* 9 (3): 246–52. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.3.10751>.
- Olier, Maïwenn, Ingrid Marcq, Christel Salvador-Cartier, Thomas Secher, Ulrich Dobrindt, Michèle Boury, Valérie Bacquié, et al. 2012. “Genotoxicity of Escherichia Coli Nissle 1917 Strain Cannot Be Dissociated from Its Probiotic Activity.” *Gut Microbes* 3 (6): 501–9. <https://doi.org/10.4161/gmic.21737>.
- Oswald, E., J. De Rycke, P. Lintermans, K. Van Muylem, J. Mainil, G. Daube, and P. Pohl. 1991. “Virulence Factors Associated with Cytotoxic Necrotizing Factor Type Two in Bovine Diarrheic and Septicemic Strains of Escherichia Coli.” *Journal of Clinical Microbiology* 29 (11): 2522–27.
- Oswald, Eric, Jean Philippe Nougayrède, Frédéric Taieb, and Motoyuki Sugai. 2005. “Bacterial Toxins That Modulate Host Cell-Cycle Progression.” *Current Opinion in Microbiology* 8 (1): 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.011>.
- Parlet, Corey P., Morgan M. Brown, and Alexander R. Horswill. 2019. “Commensal Staphylococci Influence Staphylococcus Aureus Skin Colonization and Disease.” *Trends in Microbiology* 27 (6): 497–507.
- Pass, M. A., R. Odedra, and R. M. Batt. 2000. “Multiplex PCRs for Identification of Escherichia Coli Virulence Genes.” *Journal of Clinical Microbiology* 38 (5): 2001–4.
- Payros, Delphine, Thomas Secher, Michèle Boury, Camille Brehin, Sandrine Ménard, Christel Salvadorcartier, Gabriel Cuevas-Ramos, et al. 2014. “Maternally Acquired Genotoxic Escherichia Coli Alters Offspring’s Intestinal Homeostasis.” *Gut Microbes* 5 (3): 313–25. <https://doi.org/10.4161/gmic.28932>.
- Pérès, Sylvie Y., Olivier Marchès, France Daigle, Jean Philippe Nougayrède, Frédéric Héroult, Christian Tasca, Jean De Rycke, and Eric Oswald. 1997. “A New Cytolethal Distending Toxin (CDT) from Escherichia Coli Producing CNF2 Blocks HeLa Cell Division in G2/M Phase.” *Molecular Microbiology* 24 (5): 1095–1107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4181785.x>.
- Pickett, C. L., D. L. Cottle, E. C. Pesci, and G. Bikah. 1994. “Cloning, Sequencing, and

- Expression of the Escherichia Coli Cytolethal Distending Toxin Genes.” *Infection and Immunity* 62 (3): 1046–51. <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.1046-1051.1994>.
- Pleguezuelos-Manzano, Cayetano, Jens Puschhof, Axel Rosendahl Huber, Arne van Hoeck, Henry M. Wood, Jason Nomburg, Carino Gurjao, et al. 2020. “Mutational Signature in Colorectal Cancer Caused by Genotoxic Pks + E. Coli.” *Nature* 580 (7802): 269–73. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2080-8>.
- Prorok-Hamon, Maelle, Melissa K. Friswell, Abdullah Alswied, Carol L. Roberts, Fei Song, Paul K. Flanagan, Paul Knight, et al. 2014. “Colonic Mucosa-Associated Diffusely Adherent AfaC+ Escherichia Coli Expressing LpfA and Pks Are Increased in Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer.” *Gut Microbiota* 63 (5): 761–70. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304739>.
- Purcell, Rachel V., John Pearson, Alan Aitchison, Liane Dixon, Frank A. Frizelle, and Jacqueline I. Keenan. 2017. “Colonization with Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis Is Associated with Early-Stage Colorectal Neoplasia.” *PLoS ONE* 12 (2): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171602>.
- Putze, Johannes, Claire Hennequin, Jean Philippe Nougayrède, Wenlan Zhang, Stefan Homburg, Helge Karch, Marie Agnés Bringer, et al. 2009. “Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family Enterobacteriaceae.” *Infection and Immunity* 77 (11): 4696–4703. <https://doi.org/10.1128/IAI.00522-09>.
- Raisch, Jennifer, Emmanuel Buc, Mathilde Bonnet, Pierre Sauvanet, Emilie Vazeille, Amélie de Vallée, Pierre Déchelotte, et al. 2014. “Colon Cancer-Associated B2 Escherichia Coli Colonize Gut Mucosa and Promote Cell Proliferation.” *World Journal of Gastroenterology* 20 (21): 6560–72. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6560>.
- Ramirez-Garcia, Andoni, Aitor Rementeria, Jose Manuel Aguirre-Urizar, Maria Dolores Moragues, Aitziber Antoran, Aize Pellon, Ana Abad-Diaz-de-Cerio, and Fernando Luis Hernando. 2014. “Candida Albicans and Cancer: Can This Yeast Induce Cancer Development or Progression?” *Critical Reviews in Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.913004>.



- Rodríguez-Cuesta, Juan, Fernando L. Hernando, Lorea Mendoza, Natalia Gallot, Ana Abad Díaz De Cerio, Guillermo Martínez-De-Tejada, and Fernando Vidal-Vanaclocha. 2010. "Candida Albicans Enhances Experimental Hepatic Melanoma Metastasis." *Clinical and Experimental Metastasis* 27 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9300-9>.
- Rood, Julian I., Vicki Adams, Jake Lacey, Dena Lyras, Bruce A. McClane, Stephen B. Melville, Robert J. Moore, et al. 2018. "Expansion of the Clostridium Perfringens Toxin-Based Typing Scheme." *The Neurotic Constitution* 53: 5–10. <https://doi.org/10.4324/9781315010137-7>.
- Rubinstein, Mara Roxana, Xiaowei Wang, Wendy Liu, Yujun Hao, Guifang Cai, and Yiping W Han. 2013. "Fusobacterium Nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Signaling via Its FadA Adhesin." *Cell Host & Microbe* 14 (2): 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>.
- Rycke, J. De, L. Phan-Thanh, and S. Bernard. 1989. "Immunochemical Identification and Biological Characterization of Cytotoxic Necrotizing Factor from Escherichia Coli." *Journal of Clinical Microbiology* 27 (5): 983–88.
- Samba-louaka, Ascel, Jean Philippe Nougayrède, Claude Watrin, Grégory Jubelin, Eric Oswald, and Frédéric Taieb. 2008. "Bacterial Cyclomodulin Cif Blocks the Host Cell Cycle by Stabilizing the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors P21waf1 and P27kip1." *Cellular Microbiology* 10 (12): 2496–2508. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01224.x>.
- Samba-Louaka, Ascel, Jean Philippe Nougayrède, Claude Watrin, Eric Oswald, and Frédéric Taieb. 2009. "The Enteropathogenic Escherichia Coli Effector Cif Induces Delayed Apoptosis in Epithelial Cells." *Infection and Immunity* 77 (12): 5471–77. <https://doi.org/10.1128/IAI.00860-09>.
- Schmidt, Gudula, Peter Sehr, Matthias Wilm, Jörg Selzer, Matthias Mann, and Klaus Aktories. 1997. "Gin 63 of Rho Is Deamidated by Escherichia Coli Cytotoxic Necrotizing Factor-1." *Nature* 387 (6634): 725–29. <https://doi.org/10.1038/42735>.
- Schwabe, Robert F, and Christian Jobin. 2013. "The Microbiome and Cancer." *Nature*

- Reviews. Cancer* 13 (11): 800–812. <https://doi.org/10.1038/nrc3610>.
- Scott, D. A., and J. B. Kaper. 1994. “Cloning and Sequencing of the Genes Encoding Escherichia Coli Cytotoxic Distending Toxin.” *Infection and Immunity* 62 (1): 244–51. <https://doi.org/10.1128/iai.62.1.244-251.1994>.
- Secher, Thomas, Camille Brehin, and Eric Oswald. 2016. “Early Settlers: Which *E. Coli* Strains Do You Not Want at Birth?” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 311 (1): G123–29. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2016>.
- Shiloh, Y. 2001. “ATM and ATR: Networking Cellular Responses to DNA Damage.” *Current Opinion in Genetics and Development* 11 (1): 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00159-3).
- Shimpoh, Takayuki, Yoshihiro Hirata, Sozaburo Ihara, Nobumi Suzuki, Hiroto Kinoshita, Yoku Hayakawa, Yumiko Ota, et al. 2017. “Prevalence of Pks-Positive Escherichia Coli in Japanese Patients with or without Colorectal Cancer.” *Gut Pathogens* 9 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0185-x>.
- Starý, L., K. Mezerová, K. Vysloužil, P. Zbořil, P. Skalický, M. Stašek, and V. Raclavský. 2020. “Candida Albicans Culture from a Rectal Swab Can Be Associated with Newly Diagnosed Colorectal Cancer.” *Folia Microbiologica* 65 (6): 989–94. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00807-3>.
- Suehiro, Yutaka, Kouhei Sakai, Mitsuaki Nishioka, Shinichi Hashimoto, Taro Takami, Shingo Higaki, Yoshitaro Shindo, et al. 2017. “Highly Sensitive Stool DNA Testing of Fusobacterium Nucleatum as a Marker for Detection of Colorectal Tumours in a Japanese Population.” *Annals of Clinical Biochemistry* 54 (1): 86–91. <https://doi.org/10.1177/0004563216643970>.
- Sui, Hua, Hanchen Xu, Qing Ji, Xuan Liu, Lihong Zhou, and Haiyan Song. 2015. “Cancer Metastasis by Regulating Axin1 /  $\beta$ -Catenin / MMP-7 Signaling Pathway” 6 (28).
- Sze, Marc A., and Patrick D. Schloss. 2018. “Leveraging Existing 16S RRNA Gene Surveys to Identify Reproducible Biomarkers in Individuals with Colorectal Tumors.” *BioRxiv* 9 (3): 1–16. <https://doi.org/10.1101/285486>.

- Takemura, Haruyuki, V. Ashutosh Rao, Olivier Sordet, Takahisa Furuta, Ze Hong Miao, Ling Hua Meng, Hongliang Zhang, and Yves Pommier. 2006. “Defective Mre11-Dependent Activation of Chk2 by Ataxia Telangiectasia Mutated in Colorectal Carcinoma Cells in Response to Replication-Dependent DNA Double Strand Breaks.” *Journal of Biological Chemistry* 281 (41): 30814–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603747200>.
- Tang-Fichaux, Min, Priscilla Branchu, Jean Philippe Nougayrède, and Eric Oswald. 2021. “Tackling the Threat of Cancer Due to Pathobionts Producing Colibactin: Is Mesalamine the Magic Bullet?” *Toxins* 13 (12): 1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins13120897>.
- Thomas, Andrew Maltez, Paolo Manghi, Francesco Asnicar, Edoardo Pasolli, Federica Armanini, Moreno Zolfo, Francesco Beghini, et al. 2019. “Metagenomic Analysis of Colorectal Cancer Datasets Identifies Cross-Cohort Microbial Diagnostic Signatures and a Link with Choline Degradation.” *Nature Medicine* 25 (4): 667–78. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0405-7>.
- Tjalsma, Harold, Annemarie Boleij, Julian R. Marchesi, and Bas E. Dutilh. 2012. “A Bacterial Driver-Passenger Model for Colorectal Cancer: Beyond the Usual Suspects.” *Nature Reviews Microbiology* 10 (8): 575–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2819>.
- Toprak, N Ulger, A Yagci, B M Gulluoglu, M L Akin, P Demirkalem, T Celenk, and G Soyletir. 2006. “A Possible Role of Bacteroides Fragilis Enterotoxin in the Aetiology of Colorectal Cancer.” *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12 (8): 782–86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01494.x>.
- Toth, Istvan, Frederique Herault, Lothar Beutin, and Eric Oswald. 2003. “Production of Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic Escherichia Coli Strains Isolated from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New Cdt Variant (Type IV).” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (9): 4285–91. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4285-4291.2003>.
- Tóth, István, Frédérique Héroult, Lothar Beutin, and Eric Oswald. 2003. “Production of

- Cytolethal Distending Toxins by Pathogenic Escherichia Coli Strains Isolated from Human and Animal Sources: Establishment of the Existence of a New Cdt Variant (Type IV).” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (9): 4285–91. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4285-4291.2003>.
- Tunnsjø, Hege Smith, Gro Gundersen, Fredrik Rangnes, John Christopher Noone, Alexander Endres, and Vahid Bemanian. 2019. “Detection of Fusobacterium Nucleatum in Stool and Colonic Tissues from Norwegian Colorectal Cancer Patients.” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03562-7>.
- Ulger, Nurver, Dunstan Rajendram, Aysegul Yagci, Saheer Gharbia, Haroun N. Shah, Bahadir M. Gulluoglu, Levhi M. Akin, Pakize Demirkalem, Tuncay Celenk, and Guner Soyletir. 2006. “The Distribution of the Bft Alleles among Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis Strains from Stool Specimens and Extraintestinal Sites.” *Anaerobe* 12 (2): 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.11.001>.
- Vallejo, Adrian, Naiara Perurena, Elisabet Guruceaga, Pawel K. Mazur, Susana Martinez-Canarias, Carolina Zanduetta, Karmele Valencia, et al. 2017. “An Integrative Approach Unveils FOSL1 as an Oncogene Vulnerability in KRAS-Driven Lung and Pancreatic Cancer.” *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14294>.
- Viljoen, Katie S, Amirtha Dakshinamurthy, Paul Goldberg, and Jonathan M Blackburn. 2015. “Quantitative Profiling of Colorectal Cancer-Associated Bacteria Reveals Associations between Fusobacterium Spp., Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis (ETBF) and Clinicopathological Features of Colorectal Cancer.” *PloS One* 10 (3): e0119462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119462>.
- Vogtmann, Emily, Xing Hua, Georg Zeller, Shinichi Sunagawa, Anita Y. Voigt, Rajna Hercog, James J. Goedert, Jianxin Shi, Peer Bork, and Rashmi Sinha. 2016. “Colorectal Cancer and the Human Gut Microbiome: Reproducibility with Whole-Genome Shotgun Sequencing.” *PLoS ONE* 11 (5): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155362>.
- Wallenstein, Alexander, Nadine Rehm, Marina Brinkmann, Martina Selle, Nadège

- Bossuet-Greif, Daniel Sauer, Boyke Bunk, et al. 2020. "CibR Is the Key Transcriptional Activator of Colibactin Gene Expression in Escherichia Coli." *MSphere* 5 (4): 1–25. <https://doi.org/10.1128/msphere.00727-20>.
- Wami, Haleluya, Alexander Wallenstein, Daniel Sauer, Monika Stoll, Rudolf von Büнау, Eric Oswald, Rolf Müller, and Ulrich Dobrindt. 2021. "Diversity and Prevalence of Colibactin- and Yersiniabactin Encoding Mobile Genetic Elements in Enterobacterial Populations: Insights into Evolution and Co-Existence of Two Bacterial Secondary Metabolite Determinants." *BioRxiv* 49 (0): 2021.01.22.427840. <https://doi.org/10.1101/2021.01.22.427840>.
- Wang, Dan Yang, Kang Xin He, Ying Huang, Qin Qin Lou, Ti He, and Xiao Xu. 2021. "A New Method for the Detection of Colorectal Cancer and the Precancerous Lesions: Occult Blood Testing Combination with Promoter Methylation in the Fecal Sample." *Journal of Cancer* 12 (2): 335–42. <https://doi.org/10.7150/JCA.50525>.
- Wang, Jia, Sheng Kai Huang, Mei Zhao, Mei Yang, Jia Ling Zhong, Yu Yu Gu, Hua Peng, Yi Qun Che, and Chang Zhi Huang. 2014. "Identification of a Circulating MicroRNA Signature for Colorectal Cancer Detection." *PLoS ONE* 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087451>.
- Warren, René L., Douglas J. Freeman, Stephen Pleasance, Peter Watson, Richard A. Moore, Kyla Cochrane, Emma Allen-Vercoe, and Robert A. Holt. 2013. "Co-Occurrence of Anaerobic Bacteria in Colorectal Carcinomas." *Microbiome* 1 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-16>.
- Weaver, G. A., J. A. Krause, T. L. Miller, and M. J. Wolin. 1988. "Short Chain Fatty Acid Distributions of Enema Samples from a Sigmoidoscopy Population: An Association of High Acetate and Low Butyrate Ratios with Adenomatous Polyps and Colon Cancer." *Gut* 29 (11): 1539–43. <https://doi.org/10.1136/gut.29.11.1539>.
- Weikel, C. S., F. D. Grieco, J. Reuben, L. L. Myers, and R. B. Sack. 1991. "Human Colonic Epithelial Cells, HT29/C1, Treated with Crude Bacteroides Fragilis Enterotoxin Dramatically Alter Their Morphology." *Infection and Immunity* 60 (2): 321–27. <https://doi.org/10.1128/iai.60.2.321-327.1992>.
- Whitehouse, Chris A., Paul B. Balbo, Everett C. Pesci, Daniel L. Cottle, Peter M.

- Mirabito, and Carol L. Pickett. 1998. "Campylobacter Jejuni Cytolethal Distending Toxin Causes a G2-Phase Cell Cycle Block." *Infection and Immunity* 66 (5): 1934–40.
- Wilson, Matthew R., Yindi Jiang, Peter W. Villalta, Alessia Stornetta, Paul D. Boudreau, Andrea Carrá, Caitlin A. Brennan, et al. 2019. "The Human Gut Bacterial Genotoxin Colibactin Alkylates DNA." *Science* 363 (6428). <https://doi.org/10.1126/science.aar7785>.
- Wirbel, Jakob, Paul Theodor Pyl, Ece Kartal, Konrad Zych, Alireza Kashani, Alessio Milanese, Jonas S. Fleck, et al. 2019. "Meta-Analysis of Fecal Metagenomes Reveals Global Microbial Signatures That Are Specific for Colorectal Cancer." *Nature Medicine* 25 (4): 679–89. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0406-6>.
- Woting, Anni, Nora Pfeiffer, Gunnar Loh, Susanne Klaus, and Michael Blaut. 2014. "Clostridium Ramosum Promotes High-Fat Diet-Induced Obesity in Gnotobiotic Mouse Models." *MBio* 5 (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01530-14>.
- Wu, Shaoguang, Kuei Cheng Lim, Julie Huang, Roxan F. Saidi, and Cynthia L. Sears. 1998. "Bacteroides Fragilis Enterotoxin Cleaves the Zonula Adherens Protein, E-Cadherin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (25): 14979–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14979>.
- Wu, Shaoguang, Patrice J. Morin, Dijk Maouyo, and Cynthia L. Sears. 2003. "Bacteroides Fragilis Enterotoxin Induces C-Myc Expression and Cellular Proliferation." *Gastroenterology* 124 (2): 392–400. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50047>.
- Wu, Shaoguang, Ki Jong Rhee, Emilia Albesiano, Shervin Rabizadeh, Xinqun Wu, Hung Rong Yen, David L. Huso, et al. 2009. "A Human Colonic Commensal Promotes Colon Tumorigenesis via Activation of T Helper Type 17 T Cell Responses." *Nature Medicine* 15 (9): 1016–22. <https://doi.org/10.1038/nm.2015>.
- Wu, Shaoguang, Jai Shin, Guangming Zhang, Mitchell Cohen, Augusto Franco, and Cynthia L. Sears. 2006. "The Bacteroides Fragilis Toxin Binds to a Specific Intestinal Epithelial Cell Receptor." *Infection and Immunity* 74 (9): 5382–90. <https://doi.org/10.1128/IAI.00060-06>.

- Wu, Yuanqi, Na Jiao, Ruixin Zhu, Yida Zhang, Dingfeng Wu, An Jun Wang, Sa Fang, et al. 2021. "Identification of Microbial Markers across Populations in Early Detection of Colorectal Cancer." *Nature Communications* 12 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23265-y>.
- Xie, Yuan Hong, Qin Yan Gao, Guo Xiang Cai, Xiao Ming Sun, Tian Hui Zou, Hui Min Chen, Si Yi Yu, et al. 2017. "Fecal Clostridium Symbiosum for Noninvasive Detection of Early and Advanced Colorectal Cancer: Test and Validation Studies." *EBioMedicine* 25: 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.005>.
- Xue, Mengzhao, Chung Sub Kim, Alan R Healy, Kevin M Wernke, Zhixun Wang, Madeline C Frischling, Emilee E Shine, Weiwei Wang, Seth B Herzon, and Jason M Crawford. 2019. "Structure Elucidation of Colibactin." *BioRxiv* 1000 (September): 1–31. <https://doi.org/10.1101/574053>.
- Xue, Mengzhao, Kevin M. Wernke, and Seth B. Herzon. 2020. "Depurination of Colibactin-Derived Interstrand Cross-Links." *Biochemistry* 59 (7): 892–900. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b01070>.
- Yan, Winston X., Reza Mirzazadeh, Silvano Garnerone, David Scott, Martin W. Schneider, Tomasz Kallas, Joaquin Custodio, et al. 2017. "BLISS Is a Versatile and Quantitative Method for Genome-Wide Profiling of DNA Double-Strand Breaks." *Nature Communications* 8 (May): 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms15058>.
- Yoshikawa, Yuko, Yuta Tsunematsu, Nobuo Matsuzaki, Yuichiro Hirayama, Fumi Higashiguchi, Michio Sato, Yuji Iwashita, et al. 2020. "Characterization of Colibactin-Producing Escherichia Coli Isolated from Japanese Patients with Colorectal Cancer." *Japanese Journal of Infectious Diseases* 73 (6): 437–42. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.066>.
- Yu, Jun, Qiang Feng, Sunny Hei Wong, Dongya Zhang, Qiao Yi Liang, Youwen Qin, Longqing Tang, et al. 2017. "Metagenomic Analysis of Faecal Microbiome as a Tool towards Targeted Non-Invasive Biomarkers for Colorectal Cancer." *Gut* 66 (1): 70–78. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309800>.
- Zamani, Samin, Reza Taslimi, Akram Sarabi, Seyedesomaye Jasemi, Leonardo A. Sechi, and Mohammad Mehdi Feizabadi. 2020. "Enterotoxigenic Bacteroides Fragilis: A

Possible Etiological Candidate for Bacterially-Induced Colorectal Precancerous and Cancerous Lesions.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (January): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00449>.

Zeller, Georg, Julien Tap, Anita Y Voigt, Shinichi Sunagawa, Jens Roat Kultima, Paul I Costea, Aurélien Amiot, et al. 2014. “Potential of Fecal Microbiota for Early-Stage Detection of Colorectal Cancer.” *Molecular Systems Biology* 10 (11): 766. [http://doi: 10.15252/msb.20145645](http://doi:10.15252/msb.20145645).

Zhang, Zhen, Kyaw Min Aung, Bernt Eric Uhlin, and Sun Nyunt Wai. 2018. “Reversible Senescence of Human Colon Cancer Cells after Blockage of Mitosis/Cytokinesis Caused by the CNF1 Cyclomodulin from Escherichia Coli.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36036-5>.

Zorron Cheng Tao Pu, Leonardo, Kenta Yamamoto, Takashi Honda, Masanao Nakamura, Takeshi Yamamura, Shun Hattori, Alastair D. Burt, Rajvinder Singh, Yoshiki Hirooka, and Mitsuhiro Fujishiro. 2020. “Microbiota Profile Is Different for Early and Invasive Colorectal Cancer and Is Consistent throughout the Colon.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 35 (3): 433–37. <https://doi.org/10.1111/jgh.14868>.



## 9 PUBLIKAČNÍ ČINNOST V PRŮBĚHU STUDIA

### 9.1 Publikace související s disertační prací

#### a) Původní vědecké publikace v časopisech s IF

Starý L, **Mezerová K**, Vysloužil K, Zbořil P, Skalický P, Stašek M, Raclavský V. *Candida albicans* culture from a rectal swab is associated with newly diagnosed colorectal cancer (CRC). *Folia Microbiol* 2020, 65; 989–994. (IF = 2,099)

**Mezerová K**, Starý L, Zbořil P, Klementa I, Stašek M, Špička P, Skalický P, Raclavský V. Cyclomodulins and Hemolysis in *E. coli* as Potential Low-Cost Non-Invasive Biomarkers for Colorectal Cancer Screening. *Life* (Basel). 2021 Oct 31;11(11):1165. (IF = 3,778)

#### b) Přehledné vědecké práce v časopisech s IF

Starý L, **Mezerová K**, Skalický P, Zbořil P, Raclavský V. Are we any closer to screening for colorectal cancer using microbial markers? A critical review. *Biomed Papers* 2017, 161:333-338. (IF = 1,229)

**Mezerová K**, Raclavský V, Starý L. Which bacterial toxins are worthy of validation as markers in colorectal cancer screening? A critical review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2022 Mar;166(1):1-11. (IF = 1,245)

#### c) Seznam přednášek a posterů přednesených na veřejných odborných fórech

**Mezerová K.**, Raclavský V., Janovská L., Starý L. Detekce markerů genotoxicity *E. coli* a jejich potenciál pro screening rizika spontánního kolorektálního karcinomu (CRC). Program a sborník konference RANK 2018; 7. - 8. února 2018; Pardubice; s. 46

Raclavský V., **Mezerová K.**, Starý L., Riško J., Klementa V., Zbořil P., Stašek M., Neoral Č. Kulturom pacientů s nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem – observační studie. Sborník přednášek XIV. Sympozia. Společnost pro probiotika a prebiotika; 16. dubna 2019; kongresové centrum Ústřední vojenské nemocnice, Praha 6 – Střešovice; s. 2

Raclavský V., Starý L., **Mezerová K.** Kulturom pacientů s nově diagnostikovaným karcinomem rekta. Sborník přednášek a abstrakt KMINE (VII. ročník), Olomouc, 14. - 16. 11. 2019; s. 118

**Mezerová K.**, Raclavský V., Starý L. Výskyt genotoxických bakterií druhu *Escherichia coli* u pacientů s nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem (CRC). Sborník přednášek a abstrakt KMINE (VII. ročník), Olomouc, 14. - 16. 11. 2019; s. 149

**Mezerová K.**, Raclavský V., Starý L. Markery genotoxicity bakterií *Escherichia coli* a *Bacteroides fragilis* u pacientů s nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem (CRC). Program a sborník konference RANK 2020; 5.-6. února 2020; Pardubice; s. 48 – udělena cena za nejlepší práci mladých autorů do 35 let

## 9.2 Ostatní publikace

### a) Původní vědecké publikace v časopisech s IF

Jamborova I, Janecko N, Halova D, Sedmik J, **Mezerova K.**, Papousek I, Kutilova I, Dolejska M, Cizek A, Literak I. Molecular characterization of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among corvids (*Corvus brachyrhynchos* and *Corvus corax*) roosting in Canada. *FEMS Microbiol Ecology* 2018 Nov 1;94(11). (IF = 4,0)

Bardoň J, Mlynářčík P, Procházková P, Röderová M, **Mezerová K.**, Kolář M. Occurrence of bacteria with a dangerous extent of antibiotic resistance in poultry in the Central Region of Moravia. *Acta Veterinaria Brno*. 2018, 87(2), 165-172. (IF = 0,622)

Kolar M, Htoutou Sedlakova M, Urbanek K, **Mezerova K.** et al. Implementation of Antibiotic Stewardship in a University Hospital Setting. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(1):93. (IF = 4,36)

Papajk J, **Mezerová K.**, Uvízl R, Štosová T, Kolář M. Clonal Diversity of *Klebsiella spp.* and *Escherichia spp.* Strains Isolated from Patients with Ventilator-Associated Pneumonia. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Jun 5;10(6):674. (IF = 4,36)

### b) Původní vědecké publikace v recenzním řízení

Ricci, L., Mackie J., Donachie G. E., Ambre Ch., **Mezerová K.**, Lenardon M. D., Brown A. J. P., Duncan S. H., and Walker A. W. 2021. Human Gut Bifidobacteria Inhibit the Growth of the Opportunistic Pathogen *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2022; 1–45. (IF = 4,194) Pre-print

## 10 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, GRAFŮ A ZKRATEK

### 10.1 Seznam tabulek

Tabulka 1:	Srovnání bakteriálních druhů asociovaných s CRC pacientů v různých studiích.
Tabulka 2.	Bakteriální druhy s potenciálem sloužit jako CRC markery dle jednotlivých studií
Tabulka 3.	Kultivační půdy
Tabulka 4.	Primery použité pro detekci toxinů.
Tabulka 5.	Primery použité pro určení fyloskupin izolátů <i>E. coli</i>
Tabulka 6.	Primery použité pro detekci genů toxinu <i>B. fragilis</i>
Tabulka 7.	Vybrané bakteriální druhy, které se ve zvýšené míře vyskytovaly u CRC pacientů
Tabulka 8.	Vybrané bakteriální druhy, které se ve zvýšené míře vyskytovaly u kontrol
Tabulka 9.	Diagnózy CRC pacientů starších 50 let
Tabulka 10.	Diagnózy kontrol starších 50 let
Tabulka 11.	Vybrané bakteriální druhy se zvýšeným výskytem u CRC pacientů starších 50 let
Tabulka 12.	Hodnota $p$ pro kombinace bakteriálních druhů se zvýšeným výskytem u CRC pacientů starších 50 let
Tabulka 13.	Vybrané bakteriální druhy se zvýšeným výskytem u kontrol starších 50 let
Tabulka 14.	Hodnota $p$ pro kombinace bakteriálních druhů se zvýšeným výskytem u kontrol starších 50 let
Tabulka 15.	Diagnózy CRC pacientů, od kterých byly izolovány pks+ <i>E. coli</i>
Tabulka 16.	Shrnutí diagnóz kontrolní skupiny pacientů, od kterých byly izolovány pks+ <i>E. coli</i>
Tabulka 17.	Diagnózy CRC pacientů starších 50 let, od kterých byly izolovány pks+ <i>E. coli</i>
Tabulka 18.	Diagnózy kontrol starších 50 let, od kterých byly izolovány pks+ <i>E. coli</i>

- Tabulka 19. Shrnutí statisticky významných CRC markerů u pacientů starších 50 let
- Tabulka 20. Hodnota p pro kombinace CRC markerů u pacientů starších 50 let
- Tabulka 21. Body přidělené jednotlivým markerům pro modelové skórování rizika CRC
- Tabulka 22. Odhad sensitivity a míra falešně pozitivních výsledků pro jednotlivé hranice skóre

## 10.2 Seznam obrázků

- Obrázek 1. Genetická organizace pks ostrovu *E. coli* M1/5
- Obrázek 2. Shrnutí mechanismu účinku kolibaktinu
- Obrázek 3. Krystalická struktura holotoxinu CDT
- Obrázek 4. Schéma ETBF indukované tumorigeneze
- Obrázek 5. FadA-dependentní poškození DNA prostřednictvím zvýšené exprese chk2 vedoucí k tumorigenezi
- Obrázek 6. Nárůst na všech typech kultivačních půd
- Obrázek 7. Bakteriální kultury subkultivované na anaerobním krevním agaru
- Obrázek 8. Dendrogram vybraných izolátů *E. coli*
- Obrázek 9. Dendrogram izolátů *B. fragilis*
- Obrázek 10. Dendrogram izolátů *C. albicans*

## 10.3 Seznam grafů

- Graf 1. Kategorie pacientů na základě dosaženého skóre

## 10.4 Seznam zkratk

- |      |  |
|------|--|
| 5-HT | 5-hydroxytryptaminu                              |
| BFT  | <i>Bacteroides fragilis</i> toxin                |
| BHI  | Brain Heart Infusion broth                       |
| CDT  | cytolethal distending toxin                      |
| CEC  | colon epithelial cells, epitelové buňky tračníku |
| Cif  | cycle inhibiting factor                          |
| CNF  | cytotoxic necrotising factor                     |
| CRC  | kolorektální karcinom                            |

D	velikost amplifikovaného úseku
DAEC	difuzně adherentní <i>E. coli</i>
DDR	DNA damage response
DMR	DNA methylation response
DSBs	double-strand breaks
ECE1	cell elongation 1
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
ETBF	enterotoxigenní <i>B. fragilis</i>
FIT	faecal immunochemical test
FOBT	faecal occult blood test, test okultního krvácení ze stolice
HRMA	analýza tání s vysokým rozlišením
ICLs	inter-strand crosslinks
IL	interleukin
ISZ	idiopatické střevní záněty
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MKP1	mitogenem aktivovaná proteinkináza fosfatáza 1
MS	hmotnostní spektrometrie
NRPS	nonribosomal peptide-synthetase
OD	optická hustota (denzita)
PKS	polyketid – syntáza
sDNA-FOBT	FOBT kombinovaný s detekcí metylované DNA ve stolici
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
Ta	teplota nasedání primerů
TIGIT	tlumivé receptory T lymfocytů
VNTR	variable number of tandem repeats
ZN	zhoubný novotvar

## 11 PŘÍLOHA