

## Analýza črevnej mikroflóry v bioptických vzorkách nádorov hrubého čreva

Mgr. Jakub Styk<sup>1</sup>

(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Školiteľ: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava

### Úvod

Kompozícia ľudského mikrobiálneho ekosystému, mikroflóry, hrá dôležitú úlohu pri regulácii širokého spektra fyziologických procesov. Črevná mikroflóra predstavuje kľúčový faktor ovplyvňujúci metabolizmus hostiteľa, pričom prispieva k zachovaniu správnej funkcie intestinálnej bariéry a účinnej imunitnej odpovedi proti kolonizácii patogénmi. Je známe, že zloženie intestinálnej mikroflóry vykazuje medzi jednotlivcami istú variabilitu, a je podmienené mnohými environmentálnymi faktormi, ku ktorým sa zaraďuje fyzická aktivita, stravovacie návyky, nadmerná konzumácia alkoholu, fajčenie alebo užívanie antibiotík, či iných liečiv (1). Narastajúci počet štúdií naznačuje, že črevná mikroflóra môže byť priamo zapojená do vývoja kolorektálnych adenómov a následnej progresie, vyúsťujúcej do vzniku kolorektálneho karcinómu (CRC; z angl. *colorectal cancer*). Medzi možné mechanizmy progresie CRC patrí poškodenie DNA, podpora chronického zápalu, či uvoľňovanie bioaktívnych metabolitov, ako dôsledok aktivity črevných patogénov (2). Ich kolonizácia intestinálneho epitelu je zapríčinená mikrobiálnou dysbiózou, teda narušením rovnováhy črevnej mikroflóry, ktorú možno charakterizovať zvýšeným počtom so sliznicou asociovaných patogénov a znížením celkovej druhovej variability. Boli identifikované baktérie, ako *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Helicobacter pylori*, respektíve *Escherichia coli*, ktoré predstavujú kľúčové patogény, podieľajúce sa na rozvoji zápalových ochorení čriev (IBD; z angl. *inflammatory bowel disease*) a CRC (3).

Až do roku 1940, kedy sa začali objavovať prvé patogénne varianty, boli kmene *Escherichia coli* známe ako komenzálne mikroorganizmy zdravej črevnej mikroflóry (4). V súčasnosti evidujeme niekoľko dobre definovaných enteropatogénnych kmeňov, spôsobujúcich široké spektrum IBD, vrátane Crohnovej choroby a Ulceróznej kolitídy, ktoré sú predpokladom pre vznik CRC (5). Jedným zo spôsobov, akým môžu enteropatogénne *E. coli* prispievať k rozvoju rakoviny hrubého čreva je prítomnosť toxín produkujúceho génového klastra *pks*. Predpokladá sa, že tento toxín, nazývaný colibaktín, alkyluje DNA na adenínových zvyškoch, čím môže indukovať dvojlákové zlomy, vedúce k chromozomálnym aberáciám a následnému zvyšovaniu frekvencie génových mutácií v génoch, zapojených do dráh kľúčových pre procesy kolorektálnej tumorigenézy (6). Zároveň, viaceré z črevných patogénov *E. coli* vykazujú okrem schopnosti adherovať k povrchu intestinálnej mukózy a spôsobovať lokálny zápal, aj vysoký invazívny potenciál, čím dochádza k zabezpečeniu ich replikácie a šíreniu sa v hostiteľských bunkách. Tieto patogenetické mechanizmy sú podmienené prítomnosťou ostrovov patogenicity, lokalizovaných ako na plazmidoch, tak bakteriálnych chromozómoch (7,8).

Lepšie porozumenie vzájomným interakciám medzi hostiteľom a črevnou mikroflórou môže prispieť k vývoju presnejšej personalizovanej medicíny pre pacientov s CRC. Hlavným cieľom našej práce bola analýza tkanivových biopsií kolorektálnych adenómov a karcinómov na prítomnosť enteropatogénnych variantov *E. coli*, a to na základe detekcie špecifických génov virulencie. Intracelulárna lokalizácia týchto oportúnnych patogénov by mohla poukázať na čo raz viac zdôrazňovaný prínos črevných baktérií v procese kolorektálnej karcinogenézy.

## Materiál a metódy

Molekulárnej analýze sme podrobili 10 nádorových biopsií kolorektálnych adenómov (Tab. 1 vzorky 1-5) a karcinómov (Tab. 1 vzorky 6-10), získaných od pacientov, u ktorých bolo vylúčené predchádzajúce používanie antibiotík a dokončená neoadjuvantná chemorádioterapia. Jednotlivé biopsie sme rozdelili na dve časti, ktoré sme: (i) s cieľom analýzy internalizovaných baktérií podrobili Gentamicín protekčnému testu (GPA; z angl. *gentamicin protection assay*), pričom sme postupovali podľa štúdie Swidsinski et al. (1998) a (ii) čistým fyziologickým roztokom pre analýzu extracelulárnych baktérií. Získané supernatanty sme vysievali na MacConkey agar a individuálne vyrastené kolónie sme po preočkovaní kultivovali v tekutom LB médiu. Získané bakteriálne izoláty sme analyzovali na prítomnosť *E. coli* pomocou testu ENTEROtest 24 (Erba Lachema) a MALDI-TOF hmotnostnej spektrofotometrie. Na izoláciu plazmidovej DNA (pl\_DNA) z kultúr identifikovaných ako *E. coli* sme použili JetQuick® Plasmid DNA Purification Kit (Genomed). Chromozomálnu DNA (ch\_DNA) sme izolovali pomocou Qiagen Purification Kit (QIAGEN) a celkovú bakteriálnu DNA (var\_DNA) sme extrahovali opakovaným varom a zmrazovaním na -70 °C (*boiling procedure*).

PCR prebiehala pri zložení reakčnej zmesi a teplotnom programe, ktoré sú uvedené v Tab. 1. Podmienky PCR pre detekciu génu *aspU* boli odlišné a sú uvedené v spodnej časti tabuľky.

Tab. 1 Parametre PCR.

PCR reakčná zmes	ch_DNA	pl_/var_DNA	Teplotný program			
PCR buffer 10x (Qiagen)	2.5 µL	2.5 µL	Iniciačná denaturácia	95 °C	10 min	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Qiagen)	3.0 µL	3.0 µL	Denaturácia	30x	95 °C	1 min
Mix primerov 10.0 pmol/mL (Sigma Aldrich)*	6.99 µL	6.99 µL	Anelácia		60 °C	1 min
<i>Taq</i> DNA polymeráza (Qiagen)	0.25 µL	0.25 µL	Extenzia		72 °C	1 min
dNTP (Qiagen)	2.2 µL	2.2 µL	Záverečná extenzia	72 °C	10 min	
<i>Nuclease free water</i>	7.06 µL	6.06 µL	Chladienie	4 °C	∞	
DNA templát	3.0 µL	4.0 µL				
<b>Finálny objem</b>	<b>25 µL</b>					

PCR reakčná zmes pre gén <i>aspU</i>	ch_DNA	pl_/var_DNA	Teplotný program <i>aspU</i>			
PCR buffer 10x (Qiagen)	2.5 µL	2.5 µL	Iniciačná denaturácia	94 °C	7 min	
MgCl <sub>2</sub> 25 mM (Qiagen)	3.0 µL	3.0 µL	Denaturácia	35x	94 °C	50 sek
U Primer 10.0 pmol/mL (Sigma Aldrich)	0.25 µL	0.25 µL	Anelácia		65 °C	55 sek
D Primer 10.0 pmol/mL (Sigma Aldrich)	0.25 µL	0.25 µL	Extenzia		72 °C	1 min
<i>Taq</i> DNA polymeráza (Qiagen)	0.25 µL	0.25 µL	Záverečná extenzia	72 °C	7 min	
dNTP (Qiagen)	2.2 µL	2.2 µL	Chladienie	4 °C	∞	
<i>Nuclease free water</i>	13.55 µL	12.55 µL				
DNA templát	3.0 µL	4.0 µL				
<b>Finálny objem</b>	<b>25 µL</b>					

\**eae* 0.31 µL U / 0.31 µL D; *ipaH* 0.31 µL U / 0,31 µL D; *stx* 0.625 µL U / 0.625 µL D; *elt* 0.625 µL D / 0.625 µL D; *aggR* 0.625 µL U / 0.625 µL D; *est* 1 µL U / 1 µL D

Pomocou multiplex PCR a kitu PCR Master Mix (QIAGEN) sme amplifikovali 7 génov virulencie pre 5 enteropatogénnych variantov *E. coli*, ktoré sú uvedené spolu dĺžkami PCR amplikónov (bp – bázové páry) a sekvenciami použitých U (*upstream*) a D (*downstream*) primerov:

*eae* (881 bp) pre EPEC (enteropatogénne *E. coli*)

U: 5' CCCGAATTCGGCACAAGCATAAG; D: 5' CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATT

*ipaH* (619 bp) pre EIEC (entero-invazívne *E. coli*)

U: 5'GTTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC; D: 5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC

*stx* (518 bp) pre STEC (Shiga toxín produkujúce *E. coli*)

U: 5'GAGCGAAATAATTTATATGTG; D: 5'TGATGATGGCAATTGAGTAT

*elt* (322 bp) pre ETEC (entero-toxické *E. coli*)

U: 5'TCTCTATGTGCATACGGAGC; D: 5'CCATACTGATTGCCGCAAT

*aggR* (254 bp) pre EAEC (entero-agregatívne *E. coli*)

U: 5'GTATACACAAAAGAAGGAAGC; D: 5'ACAGAATCGTCAGCATCAGC

*est* (147 bp) pre ETEC (entero-toxické *E. coli*)

U: 5'TTAATAGCACCCGGTACAAGCAG; D: 5'CCTGACTCTTCAAAGAGAAAAT

*aspU* (282 bp) pre EAEC (entero-agregatívne *E. coli*)

U: 5'GCCTTTGCGGGTGGTAGCGG; D: 5'AACCCATTCGGTTAGAGCAC

## Výsledky

Na základe výsledkov môžeme konštatovať, že spomedzi všetkých detegovaných enteropatogénnych variantov *E. coli* boli EAEC najčastejšie pozorovaným kmeňom. Prítomnosť pre nich charakteristického génu *aggR*, sme zaznamenali v 9/10 analyzovaných biopsií (Tab. 1 a 2). Na druhej strane, prítomnosť pre nich rovnako špecifického génu *aspU* sme zaznamenali len vo vzorke pochádzajúcej od pacienta s karcinómom v oblasti *flexura linealis* (Tab. 1).

**Tab.1** Pohlavie, vek, lokalizácia kolorektálneho adenómu (1-5) a karcinómu (6-10), počet analyzovaných vzoriek a sumarizácia detegovaných génov virulencie.

Pacient	Pohlavie	Vek	Lokalizácia	Vzorky	<i>est</i>	<i>aggR</i>	<i>aspU</i>	<i>elt</i>	<i>stx</i>	<i>ipaH</i>	<i>eae</i>
1	Žena	59	<i>sigma</i>	23	3	6	-	-	-	-	-
2	Muž	38	<i>sigma</i>	13	-	13	-	-	-	-	-
3	Žena	41	<i>sigma</i>	20	3	7	-	-	9	1	-
4	Žena	74	<i>sigma</i>	4	-	4	-	-	-	-	-
5*	Muž	73	<i>rectum</i>	10	3	4	-	-	-	-	2
6	Muž	59	<i>flexura linealis</i>	18	-	13	5	-	-	-	-
7	Muž	65	<i>sigma</i>	14	-	9	-	-	-	-	-
8	Muž	71	<i>anastomosis</i>	12	6	5	-	1	-	-	-
9	Muž	61	<i>rectum</i>	5	1	-	-	2	-	-	1
10	Muž	81	<i>sigma</i>	8	-	6	-	-	1	-	1

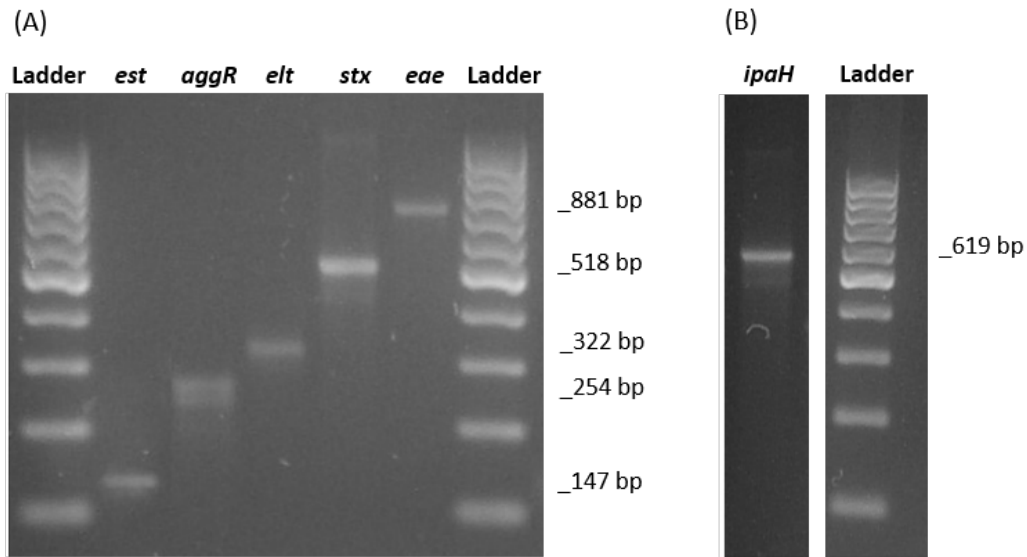
\*analýza extracelulárnych *E. coli*

**Tab.2** Sumarizácia detegovaných patogénnych variantov *E. coli* na základe génov virulencie u pacientov s kolorektálnym adenómom (1-5) a karcinómom (6-10).

Pacient	ETEC_ <i>est/elt</i>	EAEC_ <i>aggR</i>	EAEC_ <i>aspU</i>	STEC/EHEC_ <i>stx</i>	EIEC_ <i>ipaH</i>	EPEC_ <i>eae</i>
1	13 %	26 %	-	-	-	-
2	-	100 %	-	-	-	-
3	15 %	35 %	-	45 %	5 %	-
4	-	100 %	-	-	-	-
5	30 %	40 %	-	-	-	20 %
6	-	72 %	28 %	-	-	-
7	-	64 %	-	-	-	-
8	50 %	42 %	-	8 %	-	-
9	20 %	-	-	40 %	-	20 %
10	-	75 %	-	12.5 %	-	12.5 %

Najmenšie zastúpenie fragmentov sme zaznamenali v prípade produktu *ipaH*, ktorého prítomnosť sme detegovali len v jednom izoláte *E. coli*, a to u pacienta s kolorektálnym

adenómom. Vizualizáciu daného PCR produktu vo vzorke pacienta 3 zachytáva Obr. 1B. V prípade daného pacienta sme okrem génu typického pre EIEC zaznamenali prítomnosť fragmentov *est*, *aggR* a *stx*, ktoré značia predpokladanú prítomnosť ETEC, EAEC, respektíve STEC/EHEC. V prípade pacienta 5 sme vo vzorke nádorového tkaniva nezaznamenali žiadne intracelulárne lokalizované baktérie. Z toho dôvodu sme ďalšej analýze podrobili také kolónie, ktoré boli identifikované ako extracelulárne *E. coli*. Aj v tomto prípade tvoril najpočetnejšiu skupinu fragmentov PCR produkt *aggR* intestinálnych EAEC (Tab. 1 a 2). Obr. 1A zachytáva elektroforetickú separáciu amplifikovaných fragmentov *est*, *aggR*, *elt*, *stx* a *eae*.



**Obr. 1** Separácia amplifikovaných PCR produktov v 2 % agarózovej gélovej elektroforéze. Vizualizácia amplifikovaných fragmentov (A) *est* (147 bp) - ETEC, pacient 8 [var\_DNA]; *aggR* (254 bp) - EAEC, pacient 1 [var\_DNA]; *elt* (322 bp) - ETEC, pacient 9 [var\_DNA]; *stx* (518 bp) - STEC/EHEC, pacient 3 [ch\_DNA]; *eae* (881 bp) - EPEC, pacient 9 [pl\_DNA]; (B) *ipaH* (619 bp) - EIEC, pacient 3 [ch\_DNA]. Ladder\_100 bp. V hranatých zátvorkách je uvedený typ analyzovanej DNA.

## Diskusia

Identifikácia nádorovo špecifických patogénov prítomných vo vzorkách nádorového tkaniva, v porovnaní s ich absenciou u zdravých kontrol, podnecuje skúmanie ich presnej úlohy v etiológii tak heterogénneho onkologického ochorenia, akým je CRC. Je známe, že intracelulárne *E. coli* sú u pacientov s CRC pomerne často identifikovaným typom patogénu. Raisch et al. (2014) zaznamenali, že početnosť fylogenetickej podskupiny B2, do ktorej patria aj enteropatogénne kmene *E. coli*, bola v bioptických vzorkách pochádzajúcich zo sliznice pacientov s CRC na úrovni takmer 74 %, oproti 42 % kontrol (9). V našom prípade sme prítomnosť intracelulárne lokalizovaných enteropatogénnych *E. coli* zaznamenali v 90 % analyzovaných vzoriek, pričom naše výsledky korelujú s viacerými štúdiami. V tých bolo pozorované dominantné zastúpenie invadujúcich EPEC u väčšiny pacientov s kolorektálnym adenómom a karcinómom, v porovnaní so zdravými kontrolami (10,11). Vysoká prevalencia EAEC v nami analyzovaných biopsiách, a to až v 9 prípadoch (Tab. 2), môže byť vysvetlená pozorovaniami štúdie Ellis et al. (2020), ktorej výsledky naznačujú, že istý typ EAEC má vyšší potenciál ľudskej patogenézy v dôsledku kombinácie takých faktorov virulencie, ktoré podporujú kolonizáciu a zápal hostiteľských buniek (12). Okrem iného, Fang et al. (2018) pozorovali, že *E. coli* zo skupiny B2 disponujú špecializovaným mucín degradujúcim aparátom, ktorý môže prispievať ku kolonizácii črevného epitelu a následnej patogenéze IBD. Na druhej

strane, EIEC s génom virulencie *ipaH*, vyznačujúce sa vysokým invazívnym potenciálom, predstavovali najmenšiu frakciu spomedzi všetkých pravdepodobne identifikovaných patotypov *E. coli*. Predpokladá sa, že intestinálne patogény *E. coli* môžu po adhézií a následnej infekcii epitelových buniek čreva spôsobovať také zmeny, ktoré by mohli viesť k ich malígnej transformácii a následnému rozvoju kolorektálnych malignít (13). Na druhej strane, pozorovanú asociáciu enteropatogénnych *E. coli* s rakovinovými léziami je možné brať do úvahy aj ako dôkaz kauzálneho vzťahu, ktorý je opačný, a predpokladá, že nádorové mikroprostredie poskytuje týmto patogénom podmienky vhodné pre kolonizáciu črevného epitelu. Za jednu z výrazných limitácií našej práce považujeme relatívne malý súbor vyšetovaných vzoriek tkaniva. Predpokladáme, že rozšírenie počtu analyzovaných nádorov a doplnenie analýz o biopsie zdravého tkaniva, by viedlo k relevantnejším výsledkom a záverom. Sekvenačná analýza detegovaných patotypov *E. coli* a následné porovnanie výsledkov s databázami obsahujúcimi referenčné sekvencie s cieľom potvrdiť, či sa jedná o nami hľadané gény, by mohla prispieť k neustálemu objasňovaniu úlohy črevných patogénov v procese malígnej transformácie intestinálneho epitelu a rozvoja kolorektálnych adenómov, respektíve ich progresie do CRC.

## Pod'akovanie

Táto ŠVOČ vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dlhodobý strategický výskum a vývoj zameraný na výskyt Lynchovho syndrómu v populácii SR a možnosti prevencie nádorov spojených s týmto syndrómom, kód ITMS: 313011V578, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Zoznam použitej literatúry

1. Sánchez-Alcoholado L, Ramos-Molina B, Otero A, et al. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response. *Cancers* 2020; 12(6):1406.
2. Vacante M, Ciuni R, Basile F, Biondi A. Gut Microbiota and Colorectal Cancer Development: A Closer Look to the Adenoma-Carcinoma Sequence. *Biomedicines* 2020; 8(11):489.
3. Perna A, Hay E, Contieri M, De Luca A, Guerra G, Lucariello A. Adherent-invasive Escherichia coli (AIEC): Cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD? *J Cell Physiol.* 2020; (6):5041-5049.
4. Tang L, Zhou YJ, Zhu S, et al. E. coli diversity: low in colorectal cancer. *BMC medical genomics* 2020 Dec;13:1-7.
5. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(4):822-80.
6. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Rosendahl Huber A, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks<sup>+</sup> E. coli. *Nature* 2020; 580(7802):269-273.
7. Nakhjavani FA, Emaneini M, Hosseini H, et al. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2013;62(2):191-195.

8. Serapio-Palacios A, Finlay BB. Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Curr Opin Microbiol.* 2020; 54:67-76.
9. Raisch J, Buc E, Bonnet M, et al. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(21):6560-6572.
10. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 115(2):281-286.
11. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004; 127(1):80-93.
12. Fang X, Monk JM, Mih N, et al. *Escherichia coli* B2 strains prevalent in inflammatory bowel disease patients have distinct metabolic capabilities that enable colonization of intestinal mucosa. *BMC Syst Biol.* 2018; 12(1):66.
13. Ellis SJ, Crossman LC, McGrath CJ, et al. Identification and characterisation of enteroaggregative *Escherichia coli* subtypes associated with human disease. *Sci Rep.* 2020;10(1):7475.