

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Robert ŠKET

**MOLEKULARNO ODKRIVANJE BAKTERIJE
Fusobacterium nucleatum V BIOPSIJSKIH VZORCIH
PACIENTOV S KOLOREKTALNIM RAKOM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Robert ŠKET

MOLEKULARNO ODKRIVANJE BAKTERIJE *Fusobacterium nucleatum* V BIOPSIJSKIH VZORCIH PACIENTOV S KOLOREKTALNIM RAKOM

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

MOLECULAR DETECTION OF BACTERIUM *Fusobacterium nucleatum* IN THE BIOPSY SAMPLES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

M.SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avguština, za recenzentko pa doc. dr. Andrejo Natašo Kopitar.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Recenzentka: doc. dr. Andreja Nataša Kopitar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Andreja Nataša KOPITAR

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Robert Šket

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.61:616.34-006:579.844:577.2.083(043)=163.6
KG	kolorektalni rak / kolonoskopija / biopsija / osamitev mikrobne DNK / struktura mikrobiote / <i>Fusobacterium nucleatum</i> / 16s rRNK / molekularne tehnike / PCR / DGGE / qPCR
AV	ŠKET, Robert, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/KOPITAR, Andreja Nataša (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	MOLEKULARNO ODKRIVANJE BAKTERIJE <i>Fusobacterium nucleatum</i> V BIOPSIJSKIH VZORCIH PACIENTOV S KOLOREKTALNIM RAKOM
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 66 str., 6 pregl., 19 sl., 23 pril., 90 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Kolorektalni rak je bolezen pri kateri pride do nенадзорованиe rasti celic debelega črevesa ali danke. Novejše študije kot možen vzrok bolezni navajajo vnetje črevesne sluznice, kjer določeni člani mikrobne združbe debelega črevesa preoblikujejo celotni mikrobiom tako, da vnetni imunski odziv in transformacija epitelnih celic debelega črevesa vodita v nastanek raka. Eden takšnih mikrobov naj bi bila bakterija <i>Fusobacterium nucleatum</i>. V nalogi smo ugotavljali ali je v biopsijskih vzorcih tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa, pridobljenih na kliničnem oddelku za gastroenterologijo UKC v Ljubljani, pri 16 pacientih s sumom na kolorektalni rak, delež bakterije <i>F. nucleatum</i> spremenjen. Za oceno strukture in pestrosti mikrobiote smo osamili skupno mikrobno DNK. Taksonomsko informativne odseke mikrobnih genomov (gene za 16S rRNK) smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo (PCR), pomnožke analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v gradientu denaturanta (DGGE) in dobljene molekularne profile mikrobiote, ki naseljuje sluznico debelega črevesa primerjali med seboj. S specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondo za 16S rRNK bakterije <i>F. nucleatum</i> smo izvedli kvantitativni PCR v realnem času (qPCR). Pokazali smo razlike v sestavi mikrobiote pri različnih pacientih ter v sestavi mikrobiote med tumorsko spremenjeno in nespremenjeno črevesno sluznico, nismo pa potrdili sprememb v številu bakterije <i>F. nucleatum</i> v sluznici debelega črevesa, glede na to ali gre za rakovo spremenjen ali za zdrav del debelega črevesa.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 579.61:616.34-006:579.844:577.2.083(043)=163.6
CX colorectal cancer / colonoscopy / biopsy / extraction of microbial DNK / *Fusobacterium nucleatum* / microbiota / 16S rRNA / molecular techniques / PCR / DGGE / qPCR
AU ŠKET, Robert
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ KOPITAR, Andreja Nataša (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TI MOLECULAR DETECTION OF BACTERIA *Fusobacterium nucleatum* IN THE BIOPSY SAMPLES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 66 p., 6 tab., 19 fig., 23 ann., 90 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Colorectal cancer (CRC) is a disease that involves abnormal cell growth of epithelium in colon or rectum. Recent studies indicate as a possible cause of CRC the inflammation of intestinal mucosa, where certain members of the colon microbiota transform the entire microbiome so that the inflammatory immune response and transformation of epithelial cells lead to cancer. One such microbe is thought to be bacterium *Fusobacterium nucleatum*. In this work we investigated whether relative abundance of *F. nucleatum* has been changed in the colon mucosal biopsies of 16 colorectal cancer patients. The samples were obtained at the Clinical department of gastroenterology, University Medical Centre Ljubljana. The DNA was extracted directly from biopsies samples and the bacterial 16S rDNA was amplified using PCR. The PCR products were profiled using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to generate a fingerprint of the dominant members of the bacterial community associated with the biopsy. With specific primers and probe for 16S rDNA of *F. nucleatum*, quantitative real-time PCR (qPCR) was performed. Our findings reveal differences in the composition of microbiota between patients and between cancerous vs. healthy mucosa, but we could not confirm significant changes in number of *F. nucleatum* in cancerous compared to healthy mucosa.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI

1	UVOD	1
1.1	NAMEN MAGISTRSKEGA DELA	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA DEBELEGA ČREVESA	3
2.2	KOLOREKTALNI RAK	3
2.2.1	Dejavniki tveganja	3
2.2.2	Epidemiologija	4
2.2.3	Kancerogeneza	4
2.2.4	Novotvorbe debelega črevesa	6
2.2.4.1	Divertikli	6
2.2.4.2	Benigne novotvorbe	6
2.2.4.3	Maligni tumorji	7
2.2.5	Klinična slika	7
2.2.6	Diagnoza	7
2.2.6.1	Klinični pregled	7
2.2.6.2	Endoskopija	8
2.2.7	Zdravljenje	8
2.2.7.1	Operativni poseg	8
2.2.7.2	Kemoterapija in obsevanje	8
2.2.8	Kontrolni pregledi	9
2.2.9	Prognoza in presejalni testi	9

2.3	MIKROBIOTA IN KOLOREKTALNI RAK.....	9
2.3.1	Vplivi črevesne mikrobne združbe na fiziologijo epitelijskih celic črevesa	10
2.3.2	Sestava črevesne mikrobiote in »mikrobno jedro«	10
2.3.3	Modeli razvoja kolorektalnega raka zaradi vplivov mikrobiote	11
2.3.3.1	Sprememba v strukturi črevesne mikrobiote	11
2.3.3.2	Alfa bakterije	12
2.3.3.3	Bakterijski »vozniki« in »potniki« razvoja kolorektalnega raka.....	13
2.4	FUZOBAKTERIJE	14
2.4.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	14
2.4.2	Fuzobakterije in kolorektalni rak	15
2.5	METODE OPREDELJEVANJA ČREVESNE MIKROBIOTE	17
2.5.1	Hibridizacija <i>in situ</i>	18
2.5.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta (DGGE).....	18
2.5.3	Restriktični polimorfizem dolžine končnih fragmentov (TRFLP)	18
2.5.4	DNK mikromreže	19
2.5.5	PCR v realnem času (qPCR)	19
2.5.6	Sekvenciranje.....	20
3	MATERIAL IN METODE	21
3.1	MATERIAL	21
3.1.1	Vzorci in mikroorganizmi.....	21
3.1.2	Mikrobiološka gojišča	22
3.1.3	Kemikalije	23
3.1.4	Pufri in raztopine.....	24
3.1.5	Začetni oligonukleotidi.....	25
3.1.6	Laboratorijska oprema	25
3.1.7	Računalniški programi	27
3.2	METODE	28
3.2.1	Shema dela	28
3.2.2	Priprava vzorcev sluznice in vsebine debelega črevesa.....	29
3.2.3	Priprava bakterijske kulture <i>F. nucleatum</i>.....	29
3.2.4	Osamitev skupne mikrobne DNK iz vzorcev	30
3.2.5	Agarozna gelska elektroforeza	31
3.2.6	Verižna reakcija s polimerazo	31
3.2.7	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta	32
3.2.8	PCR v realnem času	33
3.2.9	Obdelava podatkov qPCR	34

4	REZULTATI.....	36
4.1	OPTIMIZACIJA METOD	36
4.1.1	Osamitev DNK iz zamrznjenih in v formalinu fiksiranih vzorcev	36
4.1.2	Uporaba različnih metod osamitve skupne mikrobne DNK in izbor najprimernejše metode	37
4.2	ANALIZA VZORCEV PACIENTOV	38
4.2.1	Sestava mikrobiote	38
4.2.1.1	Primerjava sestave črevesne mikrobiote v vzorcih nespremenjene (»zdrave«) črevesne sluznice.....	38
4.2.1.2	Primerjava sestave črevesne mikrobiote v vzorcih nespremenjene (»zdrave«) in tumorsko spremenjene črevesne sluznice	40
4.2.2	Ugotavljanje sprememb v številu <i>F. nucleatum</i> v vzorcih tumorsko spremenjene črevesne sluznice	46
4.2.2.1	Ugotavljanje števila vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice s SYBR Green qPCR.....	46
4.2.2.2	Ugotavljanje števila fuzobakterij v vzorcih črevesne sluznice s TaqMan qPCR	48
4.2.2.3	Izračun spremembe števila fuzobakterij v tumorsko spremenjeni črevesni sluznici.....	49
5	RAZPRAVA.....	51
6	SKLEPI	57
7	POVZETEK.....	58
8	VIRI	60
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava gojišča 104. PYG (DSMZ, 2009) za gojenje anaerobnih bakterij <i>F. nucleatum</i>	22
Preglednica 2: Sestava uporabljenih pufrov in raztopin	24
Preglednica 3: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	25
Preglednica 4: Povprečja ostotkov podobnosti med (i) profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice odvzete iz istega predela debelega črevesa, (ii) profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice odvzete iz različnih predelov vzdolž debelega črevesa ter med (iii) profili DGGE iz nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice	42
Preglednica 5: Odstotki podobnosti med DGGE profili iz nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice pri posameznem pacientu	42
Preglednica 6: Stopnja spremembe v številu fuzobakterijskih tarč v tumorsko spremenjeni sluznici glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa oziroma danke preiskovanih pacientov.....	49

KAZALO SLIK

Slika 1:	Fearon-Vogelsteinov model razvoja kolorektalnega raka s sovpadajočim številom genskih sprememb (Štabuc in Ferkolj, 2011)	5
Slika 2:	Tristranski odnos med (i) mikrobioto, (ii) imunskim sistemom sluznice debelega črevesa in odgovorom epitelijskih celic debelega črevesa (CEC) ter (iii) genetiko CEC prispeva k patogenezi raka na debelem črevesu (Sears in Pardoll, 2011)	10
Slika 3:	Model bakterijskih »voznikov« in »potnikov« razvoja kolorektalnega raka (Tjalsma in sod., 2012).....	13
Slika 4:	Shematski prikaz metod za opredeljevanje črevesne mikrobiote (Fraher in sod., 2012)	17
Slika 5:	Shema dela.....	28
Slika 6:	PCR program za začetne oligonukleotide FD1 in 926r ter HDA1-GC in HDA2.	32
Slika 7:	PCR program za qPCR SYBR Green in qPCR TaqMan	34
Slika 8:	DGGE gelska elektroforeza pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK iz zamrznjenih in v formalinu fiksiranih vzorcev sluznice kunčjega ter človeškega debelega črevesa	36
Slika 9:	Gelska elektroforeza skupne mikrobne DNK in PCR pomnožkov iz skupne mikrobne DNK	37
Slika 10:	Dendrogram DGGE profilov iz pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK vseh bakterij iz vzorcev nespremenjene sluznice debelega črevesa različnih pacientov.....	39
Slika 11:	Profilni DGGE pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK (desno) in dendrograma podobnosti med profili (levo) pri pacientu A in pacientu B.....	40
Slika 12:	Profilni DGGE pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK (desno) in dendrograma podobnosti med profili (levo) pri pacientu C in pacientu D.....	41
Slika 13:	Profilni DGGE pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK (desno) in dendrogrami podobnosti med profili (levo) pri pacientih H, K, L in O	43
Slika 14:	Profilni DGGE pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK (desno) in dendrogrami podobnosti med profili (levo) pri pacientih P, R in S	44
Slika 15:	Profilni DGGE pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK (desno) in dendrogrami podobnosti med profili (levo) pri pacientih I, J, M in N	45
Slika 16:	Izmerjena fluorescencija pri qPCR SYBR Green.....	47
Slika 17:	Talilna krivulja pri qPCR SYBR Green	47
Slika 18:	Izmerjena fluorescencija pri qPCR TaqMan	48
Slika 19:	Stopnja spremembe števila bakterij <i>F. nucleatum</i> v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa pacientov	50

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu A.
- Priloga B: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu B.
- Priloga C: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu C.
- Priloga D: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu D.
- Priloga E: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu E.
- Priloga F: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu F.
- Priloga G: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu G.
- Priloga H: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu H.
- Priloga I: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu I.
- Priloga J: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu J.
- Priloga K: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu K.
- Priloga L: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu L.
- Priloga M: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu M.
- Priloga N: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu N.
- Priloga O: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu O.
- Priloga P: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu P.
- Priloga Q: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu R.
- Priloga R: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu S.
- Priloga S: Izračuni sprememb v številu fuzobakterijskih tarč v tumorsko spremenjeni sluznici glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa.
- Priloga T: Izpis programa ViiA 7.0 za qPCR SYBR Green.
- Priloga U: Izpis programa ViiA 7.0 za qPCR TaqMan.
- Priloga V: Izračuni programa SPSS za Wilcoxon test.
- Priloga W: Izračuni programa SPSS za Mann-Whitney test.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	Amonijev persultat
Bp	vzorec nespremenjene (»zdrave«) sluznice debelega črevesa in danke pacientov s kolorektalnim rakom
bp	Bazni par, enota dolžine zaporedja nukleinske kisline
CRC	Kolorektalni rak (<i>angl. colorectal cancer</i>)
C _T	Mejna vrednost (<i>angl. critical threshold</i>)
CTAB	Heksadeciltrimetiamonijev bromid
DGGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta (<i>angl. denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
DNK	Deoksiribonukleinska kislina (<i>angl. deoxyribonucleic acid; DNA</i>)
dsDNA	Dvostranska molekula DNK
EDTA	Etilendiaminetetraocetna kislina (<i>angl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EtBr	Etidijev bromid
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FN	čista kultura bakterije <i>Fusobacterium nucleatum</i>
FAM	Reporter pri qPCR (<i>angl. 6-carboxyfluorescein</i>)
GC	Bazi gvanin in citozin
LB	nalagalni pufer (<i>angl. loading buffer</i>)
NTC	Vzorec brez tarče (<i>angl. no template control</i>)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>)
qPCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času (<i>angl. real-time PCR</i>)
R	vzorec tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa in danke pacientov s kolorektalnim rakom
rDNA	Ribosomska DNK (<i>angl. ribosomal DNA, rDNA</i>)
ssDNA	Enoverižna molekula DNK
TAMRA	Dušilec pri qPCR (<i>angl. tetramethylrhodamine</i>)
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin
Tm	Temperatura taljenja (<i>angl. melting temperature</i>)
UKC	Univerzitetni klinični center v Ljubljani

1 UVOD

Kolorektalni rak je izraz za maligne spremembe v sluznici debelega črevesa, danke in/ali slepiča. Maligne spremembe so kompleksne skupnosti rakavo transformiranih celic, vključno z imunskimi celicami in včasih tudi mikroorganizmi.

Gre za drugi najpogosteje diagnosticiran malignom na svetu in najpogostejši maligni tumor na prebavilih. Večjo incidenco imata le pljučni rak pri moških in rak na dojki pri ženskah (Štabuc in Ferkolj, 2011). Kljub razvoju novih diagnostičnih postopkov obolenost in posledično umrljivost zaradi kolorektalnega raka po svetu stalno naraščata. Pomembno je, da bolezen odkrijemo čim prej. Če je pacient operiran zgodaj, je rak lahko popolnoma ozdravljen. V Sloveniji ima pomembno vlogo pri odkrivanju bolezni program SVIT (Novak-Mlakar in sod., 2014).

Sprva je kolorektalni rak veljal za izključno genetsko bolezen, za katero je značilno kopiranje genetskih in epigenetskih sprememb v epitelnih celicah debelega črevesa in danke (Fearon in Vogelstein, 1990). Več kot 80 % primerov kolorektalnega raka se namreč pojavlja sporadično zaradi mutacij v genih *apc*, *k-ras*, *tp53* in drugih (Grady in Markowitz, 2002).

Do danes je bilo opravljenih več študij, ki v svojih ugotovitvah podpirajo vlogo infektivnih agensov pri razvoju kolorektalnega raka, predvsem v tistih organih, ki so stalno izpostavljeni vplivom mikroorganizmov. Takšni vplivi se kažejo v človeškem prebavnem traktu, ki ga naseljuje približno 10^{14} bakterij, ki jih uvrščamo v vsaj tisoč različnih bakterijskih vrst (Hooper in Gordon, 2001). Predlagana je bila hipoteza, da gre pri patogenezi kolorektalnega raka za tristranski odnos med črevesno mikrobioto, imunskim odzivom sluznice debelega črevesa in epiteljskimi celicami debelega črevesa (Sears in Pardoll, 2011).

Obstaja več modelov, ki poskušajo pojasniti razvoj kolorektalnega raka zaradi vplivov črevesne mikrobiote. Skupno predlaganim modelom je opredeljevanje sprememb v sestavi mikrobiote oziroma pripisovanje vloge določenim mikroorganizmom pri samem razvoju kolorektalnega raka. Med bakterijami, ki jih več študij povezuje s pojavom kolorektalnega raka, so bakterije iz rodu *Fusobacterium* in med njimi predvsem vrsta *Fusobacterium nucleatum* (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011, 2013; Marchesi in sod., 2011; McCoy in sod., 2013; Tahara in sod., 2014). Do danes pa še ni jasno ali imajo te bakterije dejansko onkogene lastnosti s katerimi pripomorejo k razvoju kolorektalnega raka ali pa so samo oportunist, ki se v tumorskem okolju razrastejo po tem, ko se kolorektalni rak že razvije (Tjalsma in sod., 2012).

1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Z magistrsko nalogo smo želeli ugotoviti, ali se v biopsijskih vzorcih sluznice debelega črevesa pacientov s kolorektalnim rakom, ki so bili odvzeti v okviru rutinskih diagnostičnih preiskav na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo UKC v Ljubljani, sestava črevesne mikrobiote v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice razlikuje od sestave mikrobiote okoliške nespremenjene oziroma zdrave sluznice debelega črevesa, ter ali pride pri tem tudi do sprememb v številu bakterije *Fusobacterium nucleatum*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Iz biopsijskih vzorcev sluznice debelega črevesa lahko z izborom primerne izolacijske metode uspešno osamimo skupno mikrobno DNK, ki bo primerne kakovosti za nadaljnje molekularno biološke raziskave
- Z znanimi molekularnimi orodji (specifični začetni oligonukleotidi, PCR v realnem času) bomo pokazali spremembe v sestavi mikrobiote in dokazali povečan delež bakterije *Fusobacterium nucleatum* v biopsijskih vzorcih tumorsko spremenjene sluznice

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA DEBELEGA ČREVESA

Debelo črevo in danka zajemata končni del prebavne cevi, ki meri od 1,2 do 1,6 m. Debelo črevo delimo na slepo črevo, kolon in danko. Za končnim delom tankega črevesa sledi slepo črevo, ki se nadaljuje v navzgor potekajoči del debelega črevesa imenovan *colon ascendens*. Ta poteka po desni lateralni trebušni strani navzgor do desnega zavoja oziroma hepatične fleksure in nato prečno kot *colon transversum* do spodnjega roba vranice. Tu v levem zavoju oziroma lienalni fleksuri zavije kot *colon descendens* navzdol po levi lateralni trebušni strani in se nadaljuje v esasto črevo oziroma *colon sigmoideum*. Od tu dalje v medenični kotanji prehaja v danko oziroma *rectum* (Markovič, 2011a).

Steno debelega črevesa sestavlja sluznica oziroma mukoza s submukozo, mišični sloj in serozna. Mukozo sestavlja epitelni sloj, lamina propria in tanka plast mišic oziroma *muscularis mucosae*. V sluznici je med epitelijskimi absorpcijskimi celicami mnogo čašastih celic, ki izločajo zaščitno sluz ter številni limfatični folikli (Markovič, 2011a). Površino sluznice povečujejo gube in kripte. Na dnu kript so zarodne celice, ki se diferencirajo v različne tipe celic debelega črevesa (Humphries in Wright, 2008).

Osrednje funkcije debelega črevesa so absorpcija, sekrecija ter transport. Tako se v debelem črevesu resorbirajo voda in elektroliti, kot tudi kratkoverižne maščobne kisline, ki se sprostijo pri bakterijski fermentaciji v tankem črevesu neabsorbiranih snovi. Absorbirane kratkoverižne maščobne kisline so poglavito hranilo epitelijskih celic kolona, ki ga potrebujejo za svojo obnovo. Poleg absorpcije v debelem črevesu poteka tudi izločanje npr. kovin (svinec, živo srebro) ter transport črevesne vsebine, ki ga omogoča črevesna peristaltika (Markovič, 2011a).

2.2 KOLOREKTALNI RAK

Rak, ki se razvije v debelem črevesu ali danki, imenujemo kolorektalni rak (CRC; angl. colorectal cancer).

2.2.1 Dejavniki tveganja

Neposredni vzrok za nastanek kolorektalnega raka še ni poznan. Poznani dejavniki tveganja so povišana starost, spol, debelost, alkoholizem in kajenje (Wu in sod., 1987; Ferlay in sod., 2013). Tveganje povečuje uživanje energetsko bogate hrane, ki vsebuje veliko mesa, beljakovin in maščob in premajhna telesna aktivnost. Zaščitno vlogo ima prehrana z žiti, zelenjavom in sadjem, ki vsebuje veliko vlaknin in vitaminov A, C, D ter kalcija. Vlaknine vežejo žolčne kisline in kancerogene snovi, kot so npr. fekapentini, ki jih v debelem črevesu proizvajajo bakterije iz rodu *Bacteroides* (Huycke in Gaskins, 2004). Zaužite vlaknine zaradi večje mase blata skrajšajo čas prehajanja blata skozi črevo in posledično je črevesna sluznica krajiši čas izpostavljena škodljivemu delovanju zgoraj omenjenih snovi. Zaščitna vloga kalcija pred nastankom kolorektalnega raka je, da se veže z žolčnimi kislinami v netopne soli (Štabuc in Ferkolj, 2011). Poleg omenjenih dejavnikov tveganje za nastanek kolorektalnega raka predstavljajo še adenomatozni polipi črevesne sluznice (Keku in sod.,

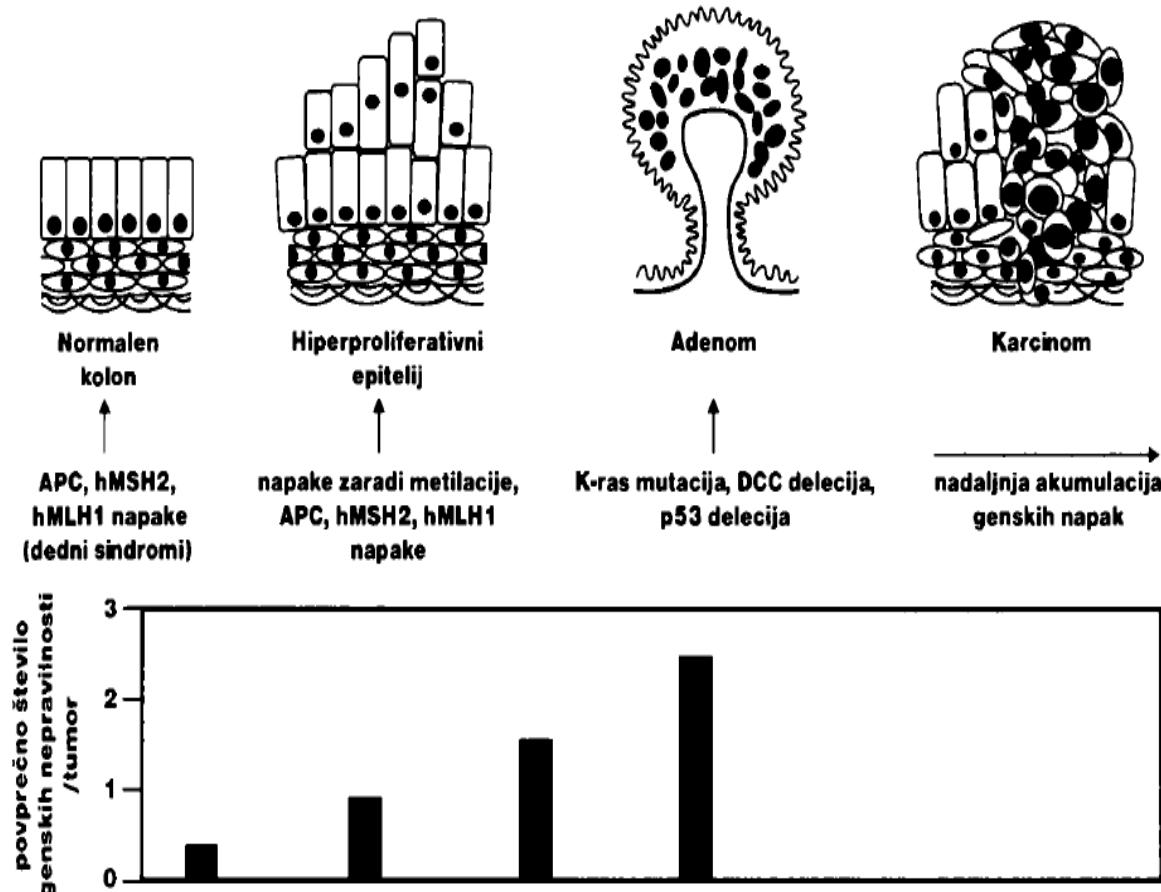
2013), dolgotrajne vnetne črevesne bolezni, kot sta Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis (Triantafillidis in sod., 2009), obsevanje ter genetski dejavniki. V družinah, kjer je prisoten kakršen koli rak, je tveganje za razvoj kolorektalnega raka 2-3 × višje (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.2 Epidemiologija

Letno na svetu odkrijejo okoli 1,4 milijona novih primerov kolorektalnega raka in od tega se jih skoraj polovica konča s smrtjo (Ferlay in sod., 2013). Od leta 2008 je v svetu kolorektalni rak drugi najpogostejši rak pri ženskah in tretji najpogostejši pri moških. Okoli 60 % vseh primerov je diagnosticiranih v razvitem svetu, največ jih je zaznanih v severni Ameriki, Evropi in v Avstraliji (Štabuc in Ferkolj, 2011). V Sloveniji je kolorektalni rak drugi najpogostejši rak tako pri moških (za pljučnim rakom) kot pri ženskah (za rakom na dojki). Med obboleli je več moških. Leta 2012 je v Sloveniji za kolorektalnim rakom zbolelo 1621 ljudi in umrlo 813. V primerjavi z Evropo spada Slovenija med dežele z zelo visoko obolenostjo in umrljivostjo. Rast števila obbolelih je pričakovana tudi v prihodnje (Ferlay in sod., 2013).

2.2.3 Kancerogeneza

Osnovni molekularni model večstopenjskega razvoja kolorektalnega raka sta predlagala Fearon in Vogelstein (1990). Na osnovi preučevanja DNK iz biopsij črevesa sta dokazala, da v celicah epitela prihaja do kopiranja genskih in epigenetskih sprememb (Fearon, 2011). Do mutacij lahko prihaja tudi v zarodnih celicah na dnu kript (Humphries in Wright, 2008). Sočasno s temi spremembami je značilno napredovanje histoloških sprememb in neoplastična progresija, kot so epitelijske displazije in hiperplazije v debelem črevesu, kar vodi v nastanek kolorektalnega raka (Slika 1) (Vogelstein in Kinzler, 1993; Fearon, 2011; Štabuc in Ferkolj, 2011).



Slika 1: Fearon-Vogelsteinov model razvoja kolorektalnega raka s sovpadajočim številom genskih sprememb (Štabuc in Ferkolj, 2011).

Celične genske spremembe so večinoma somatske in se s časom kopičijo. Za nastanek raka so poleg genetskih mutacij potrebne še epigenetske spremembe. V primeru sprememb v somatskih celicah govorimo o sporadičnem raku, medtem ko lahko mutacije v zarodnih celicah povzročijo dedno obliko raka. Do kopičenja genetskih napak, ki imajo za posledico nastanek raka, pride v onkogenih, tumorsko zaviralnih in mutorskih genih. Genetske spremembe povzročijo genomsko nestabilnost rakavih celic in če se ta izrazi na ravni kromosomov, jo imenujemo kromosomska nestabilnost (CIN; angl. chromosomal instability). Pri 80-85 % sporadičnih kolorektalnih karcinomov so opazili kromosomsko nestabilnost in so zato označeni kot CIN pozitivni (Lengauer in sod., 1998; Štabuc in Ferkolj, 2011). Primer CIN je sprememba tumor supresorskega gena *apc* (angl. adenomatous polyposis coli), ki med celično delitvijo poskrbi za vzdrževanje celovitosti in števila kromosomov (Phelps in sod., 2009). Drugi geni, katerih spremembe vplivajo na kancerogenezo kolorektalnega raka, so gen *ctnnb1* za β-katenin, gen *dcc* (angl. deleted in colorectal cancer) in gen *tp53*. Gen *ctnnb1* sodeluje pri nadzoru genske transkripcije, *dcc* inducira apoptozo celic v črevesnih kriptah in tako prepreči maligne transformacije celic, *tp53* pa nadzoruje celične procese kot so celična rast, diferenciacija, popravljanje DNK in

nadzorovana celična smrt oziroma apoptoza (Mehlen in Fearon, 2004; Iacopetta, 2003; Phelps in sod., 2009; Sheng in sod., 1998). Do razvoja raka lahko pride tudi zaradi mutacij v onkogenu *k-ras* (angl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), ki nadzoruje celično proliferacijo (Phelps in sod., 2009). Poleg CIN poznamo še druge vrste genskih mutacij, ki so vpletene v nastanek kolorektalnega raka. To so mutacije v genih BER (angl. base excision repair) in MMR (angl. mismatch repair), ki so odgovorni za popravljanje napak pri podvojevanju DNK. Mutacije v sistemu genov MMR povzročajo mikrosatelitsko nestabilnost, ki jo označujemo z MSI (angl. microsatellite instability). Primer MMR genov sta gena za MLH1 in MSH2 (Jass, 2007). Za nastanek raka niso dovolj le mutacije v zgoraj naštetih genih, ampak so potrebne tudi epigenetske spremembe v sistemu genov MMR. Najpogostejša epigenetska sprememba je hipermetilacija citozina v otočkih CpG (angl. cytosine-phosphate-guanine island) in posledično utišanje zgoraj omenjenih genov. Takšen tip genske okvare je navzoč v 80 % vseh kolorektalnih karcinomov in jo označujemo s CIMP (angl. CpG island methylator phenotype) (Štabuc in Ferkolj, 2011). Razvoj bolezni iz benigne v maligno obliko oziroma iz adenoma v karcinom poteka zelo počasi, saj se morajo najprej zgoditi za to potrebne mutacije v tumor zavirálnih genih ali pa v onkogenih, kar pa je odvisno od same pogostosti mutacij (Tjalsma in sod., 2012). Zgoraj naštete mutacije in spremembe genov povzročijo: (i) celično rast brez zunanjih signalov rasti, (ii) neobčutljivost za protirastne signale, (iii) izmikanje apoptozi in uničenju zaradi delovanja imunskega sistema, (iv) neomejen replikacijski potencial, (v) povečano angiogenezo oziroma ožiljevanje in (vi) invazijo v okoliško tkivo oziroma metastaziranje (Hanahan in Weinberg, 2011). Sam genski profil kolorektalnega raka vpliva na njegovo klinično, histološko in biološko sliko. Med vsemi tumorji imajo najslabšo prognozo tumorji CIN (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.4 Novotvorbe debelega črevesa

2.2.4.1 Divertikli

Črevesni divertikli so izbočenja črevesne stene v obliki mešičkov. Njihovo ustje običajno meri 5-10 mm. Divertikli lahko nastanejo v katerem koli delu debelega črevesa, razen v področju danke (Hafner, 2011).

2.2.4.2 Benigne novotvorbe

Polipi so lokalizirane površinske lezije sluznice prebavil dvignjene nad raven sosednje sluznice. Gre za benigne oblike novotvorb, ki se med seboj makroskopsko in histološko močno razlikujejo. Po oblikah jih ločimo na pecljate, sesilne in ploske polipe, histološko pa na adenomatozne polipe oziroma adenome, hiperplastične, hamartome, juvenilne in vnetne polipe oziroma psevdopolipe ter polipe fundičnih žlez (Markovič, 2011b).

Adenomi so neoplastične sluznične lezije z mutacijo v genu *apc*. Večino adenomov odkrijejo v debelem črevesu. Histološko jih delimo v tubularne, tubulovilozne, vilozne in nazobčane adenome, glede na citološke spremembe pa v adenome z nizko ali z visoko stopnjo

intraepitelijske neoplazije/displazije¹. Iz adenomov se lahko razvije kolorektalni rak v zaporedju dogodkov, ki jih imenujemo adenomsko-karcinomska sekvenca. Maligni potencial adenomov se viša z njihovo velikostjo in histološko zgradbo (Markovič, 2011b).

2.2.4.3 Maligni tumorji

Najpomembnejša dejavnika tveganja za razvoj malignih tumorjev sta družinska polipoza kolona in Crohnova bolezen. Maligno novotvorbo oziroma neoplazmo, ki se razvije iz žleznih epitelijskih celic imenujemo adenokarcinom (Markovič, 2011a). Med vsemi kolorektalnimi raki je 90 % adenokarcinomov, preostali delež predstavljajo limfomi oziroma rak limfatičnega sistema ter ploščatocelični karcinomi (Ferlay in sod., 2013). Adenokarcinomi navadno kažejo visoko stopnjo malignosti in najpogosteje metastazirajo v jetra, pljuča in kosti (Markovič, 2011a).

2.2.5 Klinična slika

Znaki kolorektalnega raka so odvisni od lokacije tumorja v črevesju in njegove razširjenosti po telesu v obliki metastaz, večinoma pa so neznačilni. Najpogosteji znaki kolorektalnega raka so občasna bolečina v trebuhu, sprememba ritma iztrebljanja, občutek nepopolne izpraznitve črevesa, slabost, bruhanje, hujšanje in splošno slabo počutje. Zaradi krvavitve iz tumorja se razvije anemija zaradi pomanjkanja železa, kar je pri tumorjih v predelu navzgornjega kolona običajno prvi znak, zaradi katerega pride bolnik k zdravniku. Včasih je krvavitev lahko tudi akutna. Takrat je blato pomešano s svetlo krvjo in sluzjo (Štabuc in Ferkolj, 2011). Tumorji v navzdolnjem kolonu in esastem črevesu lahko povzročijo delno ali popolno zapor črevesne vsebine. Pride lahko do predrtja debelega črevesa. V primeru akutnega predrtja so značilni znaki bolečina, zvišana telesna temperatura in otipljiva zatrdlina (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.6 Diagnoza

V diagnostičnem postopku odkrivanja kolorektalnega raka je pomembna natančna družinska in osebna anamneza. Potrebno je ugotoviti morebitne dedne dejavnike in dejavnike tveganja za razvoj kolorektalnega raka. Pri vsakem bolniku, starejšem od 40 let, ki ima anemijo zaradi pomanjkanja železa, neznačilne bolečine v trebuhu, spremembe v izpraznjevalnem ritmu in je opaziti kri v blatu, moramo posumiti na raka. Posebno pozornost je potrebno nameniti bolnikom s povečanim tveganjem za nastanek raka, kot so bolniki z adenomi in bolniki s kroničnimi vnetnimi boleznimi črevesa (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.6.1 Klinični pregled

Klinični pregled je sestavljen iz splošnega kliničnega pregleda, kjer zatipamo povečane dimeljske bezgavke, povečana jetra in vranico. Pregled s prstom ali digitorektalni pregled je poleg splošnega kliničnega pregleda sestavni del kliničnega pregleda. Prikrite krvavitve v blatu ugotavljamo s hematestom. Pozitiven test je indikacija za nadaljnjo endoskopsko

¹ Intraepitelijska neoplazija/displazija pomeni, da rakava sprememba ne sega v mukozo ali submukozo.

diagnostiko. Včasih je prvi simptom anemija zaradi pomanjkanja železa, ki nastane zaradi prikrite krvavitve. Pri diagnozi lahko spremljamo tumorske označevalce kot je karcinoembrionični antigen (CEA; *angl. carcinoembryonic antigen*), ki pa je povišan le pri 60 % bolnikov s kolorektalnim rakom (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.6.2 Endoskopija

Najpomembnejša metoda pri odkrivanju raka debelega črevesa in danke je endoskopija debelega črevesa in danke (rektoskopija, sigmoidoskopija, kolonoskopija). S to metodo je mogoč natančen pregled sluznice črevesa in bioptični odvzem tkiva ter polipov za histološko preiskavo. S pomočjo endoskopije lahko opišemo velikost in lego tumorja ter obliko tumorske rasti. Najbolj zanesljiva preiskovalna metoda je kolonoskopija, ki z največjo verjetnostjo, le pri 5 % kolonoskopskih preiskav je rezultat lažno negativen, potrdi ali izključi navzočnost tumorja. Pri odkrivanju črevesnega raka uporabljamo tudi virtualno kolonoskopijo, ki sestoji iz tridimenzionalne računalniške tomografije, ki skupaj s kolonografijo omogoča natančno lokalizacijo tumorja v črevesu (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.7 Zdravljenje

Pred začetkom zdravljenja moramo določiti mesto primarnega tumorja, histološko opredeliti in potrditi tumor, odkriti morebitne adenome in sinhrone tumorje v drugih delih črevesa, določiti lokalno razširjenost tumorja, prizadetost regionalnih bezgavk in ugotoviti morebitne oddaljene zasevke. Pri tem je v uporabi TNM klasifikacija bolezni. Z oznakami T1-T4 opredelimo globino vraščanja tumorja oziroma preraščanja črevesne stene, zasevke v regionalnih bezgavkah opredelimo z oznakami N0-N2 in oddaljene zasevke z oznakami M0-M1. Odločitev o vrsti zdravljenja je odvisna od razširjenosti bolezni, predhodne dopolnilne kemoterapije, stanja telesne zmogljivosti, starosti, spremljajoče bolezni in bolnikove sprejemljivosti do zdravljenja (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.7.1 Operativni poseg

Kirurško zdravljenje kolorektalnega raka je najpogosteji način zdravljenja bolnikov v vseh stadijih bolezni. V zgodnjem stadiju tumor v celoti odstranimo s kolonoskopsko elektroresekcijo. Popolna odstranitev tumorja oziroma radikalna operacija je edini način zdravljenja, ki daje bolniku možnost ozdravitve (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.7.2 Kemoterapija in obsevanje

Pri zdravljenju zasevkov se pred morebitno operacijo izvaja kemoterapija. V kombinaciji z obsevanjem se izvaja tudi dopolnilna kemoterapija, ki predstavlja standardni način zdravljenja radikalno operiranih bolnikov. Zdravljenje z obsevanjem in kemoterapijo se uporablja tudi kot paliativni način zdravljenja bolnikov z metastatskim rakom, kjer je glavno vodilo izboljšanje telesnega in psihosocialnega počutja (Štabuc in Ferkolj, 2011).

2.2.8 Kontrolni pregledi

Prvi dve leti po operaciji se kontrolni pregledi bolnikov izvajajo vsake tri mesece, nato vsakih šest mesecev, po petih letih pa enkrat letno. Pri bolnikih, ki so imeli pred operacijo kolonoskopijo, pa prvo kontrolno kolonoskopijo napravimo tri leta po operaciji. Če je kolonoskopski izvid normalen, ponovimo kolonoskopijo vsakih 36 mesecev. Pri bolnikih z rakom danke vsakih 12 mesecev naredimo še rektoskopijo (Štabuc in Ferkolj, 2011).

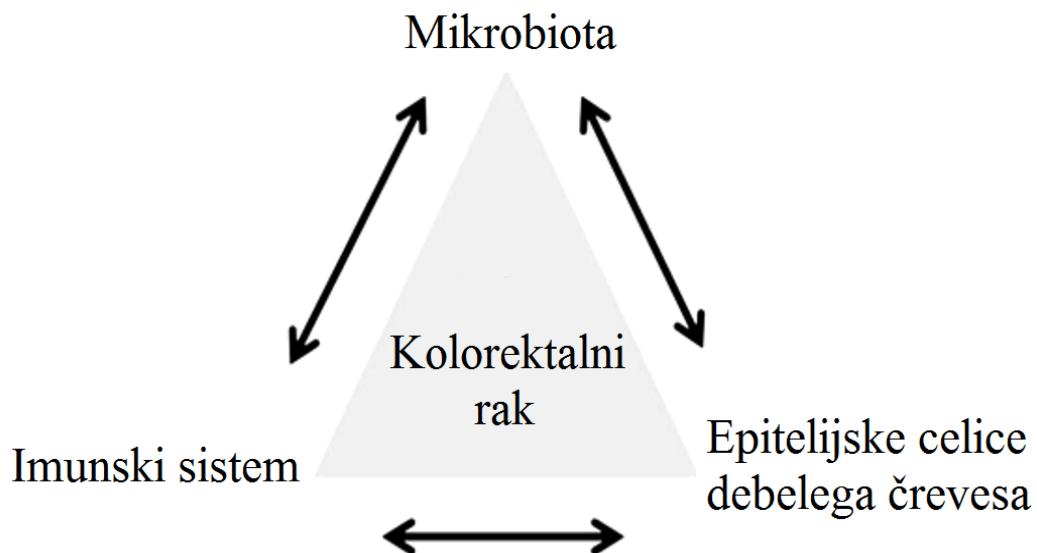
2.2.9 Prognoza in presejalni testi

Kljub novim diagnostičnim postopkom obolenost in z njem povezana umrljivost zaradi raka na debelem črevesu po vsem svetu stalno narašča. V zadnjem desetletju je bil narejen velik napredok v razumevanju molekularnih, biokemičnih in epidemioloških značilnostih ter terapevtskih možnosti pri črevesnem raku. Pri tem ima pomembno vlogo presejanje, saj na ta način odkrivamo zgodnje oblike raka ter tako pomembno zmanjšamo zbolevanje in umrljivost. Najpogosteje uporabljamo teste za odkrivanje prikrite krvavitve v blatu pri ljudeh v starosti od 50 do 74 let vsaki dve leti (Štabuc in Ferkolj, 2011).

Državni program presejanja in zgodnjega odkrivanja predrakovih sprememb in raka na debelem črevesu in danki izvaja Program Svit, katerega nosilec je Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije in znotraj tega Center za preprečevanje kroničnih bolezni CINDI. Program omogoča odkrivanje prikritih krvavitev v blatu in po potrebi še natančneje preiskavo črevesa. Tako je bilo od 1.1. do 31.12.2013 v program povabljenih 248.004 oseb. Presejane je bilo 56,10% povabljene populacije in 8.197 (6,15%) oseb je imelo pozitiven izvid prikrite krvavitve. V letu 2013 je bilo izvedenih 7.969 kolonoskopij (Novak-Mlakar in sod., 2014).

2.3 MIKROBIOTA IN KOLOREKTALNI RAK

Da kolorektalni rak ni le genetska bolezen nakazujejo rezultati študij, ki podpirajo vlogo infektivnih agensov pri razvoju kolorektalnega raka, predvsem v tistih organih, ki so stalno izpostavljeni vplivom mikroorganizmov. Primer je človeški prebavni trakt, kjer je približno 10^{14} bakterij, ki jih uvrščamo v vsaj 10^3 različnih bakterijskih vrst (Hooper in Gordon, 2001). Na podlagi vplivov mikroorganizmov v prebavnem traktu, sta Sears in Pardoll (2011) predlagala, da gre pri patogenezi kolorektalnega raka za tristranski odnos med mikrobioto oziroma mikrobeno združbo prebavil, imunskim odzivom sluznice debelega črevesa in epiteliskimi celicami debelega črevesa (CEC; *angl. colonic epithelial cells*) (Slika 2).



Slika 2: Tristranski odnos med (i) mikrobioto, (ii) imunskim sistemom sluznice debelega črevesa in odgovorom epithelijskih celic debelega črevesa (CEC) ter (iii) genetiko CEC prispeva k patogenezi raka na debelem črevesu (Sears in Pardoll, 2011).

2.3.1 Vplivi črevesne mikrobne združbe na fiziologijo epithelijskih celic črevesa

Kompleksnost črevesne mikrobiote ima ključno vlogo pri ohranjanju zdravja ljudi. Pomaga pri oblikovanju homeostaze epithelijskih celic, omogoča proizvodnjo vitaminov in fizično onemogoča razrast patogenih mikroorganizmov (Tjalsma in sod., 2012). V distalnem črevesju človeka imajo lahko mikrobi poleg koristnih, tudi škodljive učinke na gostiteljevo fiziologijo. Primer je spodbuditev kroničnega vnetnega odziva, ki je eden glavnih dejavnikov tveganja za razvoj kolorektalnega raka. Tako v primeru ulceroznega kolitisa vnetje črevesne sluznice poveča tveganje za zgodnji razvoj črevesnega raka za $8-30 \times$ (Štabuc in Ferkolj, 2011). Primer posredne povzročitve raka zaradi kroničnih vnetnih odzivov, ki jih izzovejo prisotnost oziroma toksični produkti mikroorganizma, je bakterija *Helicobacter pylori*, ki izzove nastanek raka na želodcu (Cover in Blaser, 2009). Povzročitev razvoja raka zaradi mikroorganizmov je lahko tudi neposredna, kot je v primeru humanega papiloma virusa, ki je odgovoren za razvoj raka materničnega vrata (zur Hausen, 2009). V črevesju prisotne bakterije lahko povzročijo razvoj kolorektalnega raka tudi s proizvajanjem superoksidnih radikalov, ki poškodujejo DNK epithelijskih celic, proizvodnjo genotoksinov in od T-pomožnih celic odvisno indukcijo celične proliferacije (Marchesi in sod., 2011).

2.3.2 Sestava črevesne mikrobiote in »mikrobno jedro«

Za lažjo opredelitev vloge mikroorganizmov pri razvoju kolorektalnega raka je potrebno najprej opredeliti sestavo mikrobiote v črevesju zdravega človeka, kot je cilj raziskav v okviru projekta človeškega mikrobioma (angl. Human Microbiome Project) in MetaHIT (angl. Metagenomics of the Human Intestinal Tract) (Turnbaugh in sod., 2007; Qin in sod., 2010).

Eckburg in sodelavci (2005) so med prvimi v vzorcih fecesa in sluznice debelega črevesa zdravih ljudi pokazali prisotnost vsaj 400 različnih bakterijskih vrst. Z molekularnimi metodami za profiliranje mikrobiote črevesa (DGGE, sekvenciranje bakterijskih ribosomskih genov) je bilo pokazano, da sestava črevesne mikrobiote pri različnih ljudeh ni enaka, medtem ko je mikrobna kolonizacija črevesne sluznice vzdolž debelega črevesa pri odraslih ljudeh razmeroma stabilna (Green in sod., 2006; Costello in sod., 2009).

Kljub različni sestavi mikrobiote med različnimi ljudmi, se je pokazalo, da v distalnem delu črevesa najdemo določen katalog skupnih bakterijskih genov, ki jih je možno zaslediti pri večini ljudi (angl. core microbiome) (Turnbaugh in sod., 2007; Turnbaugh in Gordon, 2009; Qin in sod., 2010). Nadalje so se oblikovale zamisli o »skupnem mikrobnem jedru« (angl. common bacterial core), kjer je pri vsakem posamezniku mogoče najti določene predstavnike mikrobine združbe (Qin in sod., 2010). Več kot 90 % vseh bakterijskih vrst v črevesni mikrobioti spada v le dve bakterijski debli, to sta *Bacteroidetes* in *Firmicutes* (Qin in sod., 2010). Nato sledita debli *Proteobacteria* in *Actinobacteria* ter v manjšem deležu še debla *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* in *Cyanobacteria* (Eckburg in sod., 2005).

Dognanje o stabilnosti sestave mikrobine združbe vzdolž kolona pri istem človeku oziroma o možnosti obstoja »mikrobnega jedra« pri različnih ljudeh, je pripeljalo do nove predpostavke. Avtorji nadaljnjih študij so v grobem predpostavili, da v kolikor igra mikrobiota aktivno vlogo pri patogenezi kolorektalnega raka, bodo »odgovorni« mikrobi v tumorskem mikrookolju tudi prisotni, struktura mikrobiote tumorja pa se bo razlikovala od mikrobiote sosednjega zdravega tkiva. Predpostavili so tudi, da se bo sestava črevesne mikrobiote bolnikov s kolorektalnim rakom razlikovala od črevesne mikrobiote zdravih ljudi. Danes znana primera, kjer spremembo strukture črevesne mikrobiote povezujemo s patogeno bolezni sta Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis (Frank in sod., 2007; Turnbaugh in sod., 2007; Qin in sod., 2010). Predlaganih je več modelov s katerimi pojasnjujemo na kakšen način naj bi črevesna mikrobiota vplivala na razvoj kolorektalnega raka.

2.3.3 Modeli razvoja kolorektalnega raka zaradi vplivov mikrobiote

2.3.3.1 Sprememba v strukturi črevesne mikrobiote

Opravljenih je bilo več študij, kjer so raziskovali potencialne razlike oziroma spremembe v sestavi mikrobiote v fecusu bolnikov s kolorektalnim rakom in zdravih ljudi (Ahn in sod., 2013; Sobhani in sod., 2011) ter v sestavi mikrobiote, ki kolonizira zdravo oziroma tumorsko spremenjeno črevesno tkivo istega bolnika (Marchesi in sod., 2011).

Sobhani in sodelavci (2011) so raziskovali sestavo mikrobiote v vzorcih fecesa bolnikov s kolorektalnim rakom in jo primerjali s sestavo mikrobiote v fecusu zdravih ljudi. Kljub temu, da naj bi se sestava mikrobiote pri različnih ljudeh razlikovala (Green in sod., 2006; Costello in sod., 2009), so avtorji pokazali, da so razlike v sestavi mikrobiote med bolniki in zdravimi ljudmi večje kot pa samo med bolniki oziroma samo med zdravimi ljudmi (Sobhani in sod., 2011). Tudi Ahn in sodelavci (2013) so pokazali razlike v sestavi mikrobiote v fecusu bolnikov in zdravih ljudi. Dodatno so pri bolnikih pokazali manjšo diverziteto mikrobiote,

zmanjšano število bakterij iz razreda *Clostridia* ter povečano število bakterij iz rodov *Fusobacterium* ter *Porphyromonas* (Ahn in sod., 2013).

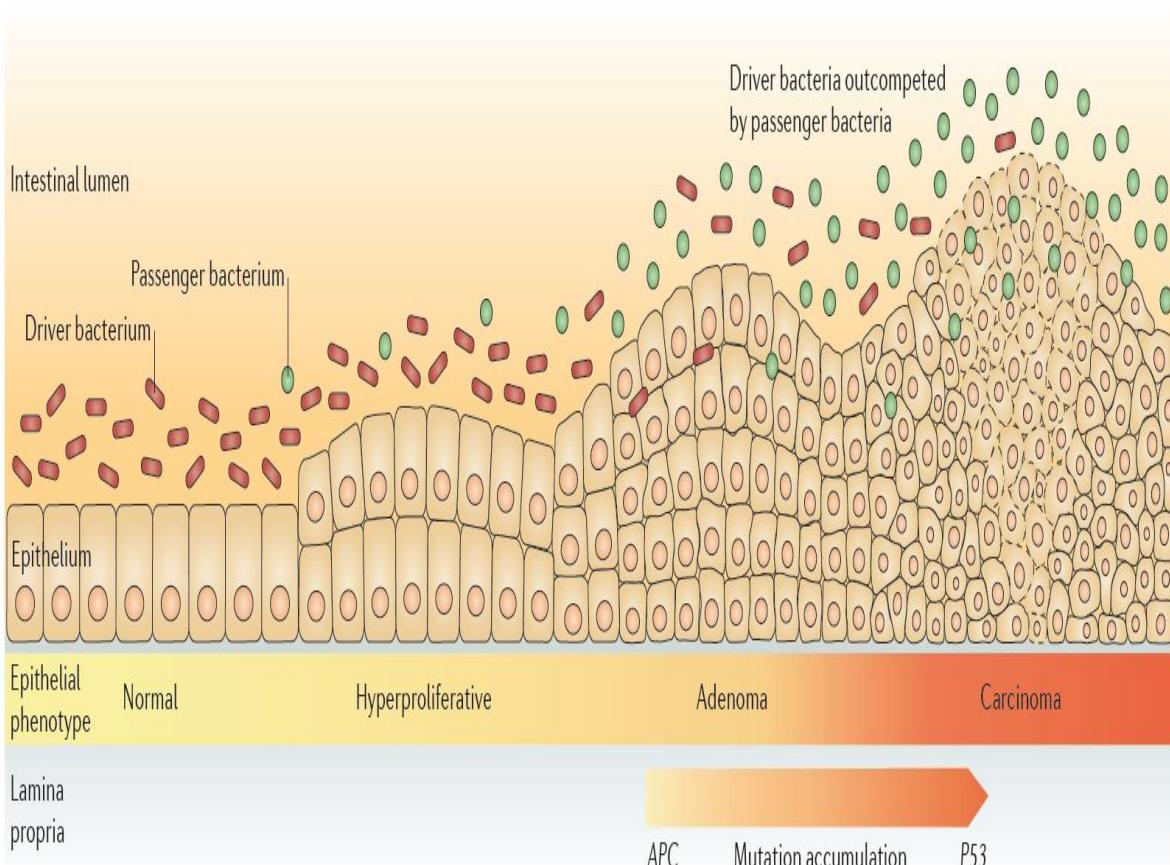
Za razliko od zgoraj navedenih študij, so Marchesi in sodelavci (2011) z metodo sekvenciranja bakterijske rRNK analizirali sestavo mikrobiote v tumorsko spremenjeni in v bližnji zdravi črevesni sluznici bolnikov s kolorektalnim rakom. Avtorji so v mikrobioti tumorsko spremenjene sluznice pričakovali povečano prisotnost potencialno patogenih mikroorganizmov, ki bi jih lahko posredno povezali z nastankom kolorektalnega raka. Pri petih od šestih preiskovanih pacientov so ugotovili, da v primerjavi med tumorsko spremenjeno in oddaljeno nespremenjeno sluznico pride do dramatičnih sprememb v sestavi tamkajšnje mikrobiote. Nasprotno od pričakovanega v tumorskem tkivu ni bilo povečano število patogenih bakterij, ampak so bili to predstavniki rodov *Coriobacteridae*, *Roseburia*, *Fusobacterium* in *Faecalibacterium*, ki splošno veljajo za črevesne komenzalne bakterije s probiotiskimi značilnostmi. Na podlagi tega so avtorji zaključili, da so bili premiki v sestavi mikrobiote posledica dramatičnih fizioloških in presnovnih sprememb, ki so posledica same kancerogeneze (Marchesi in sod., 2011). Da pride do sprememb v količini dostopnih nutrientov v tumorskem okolju sluznice so pokazali Hirayama in sodelavci (2009). Večina rakavih celic proizvaja glavnino energije z glikolizo in ne s Krebsovim ciklom. Vzrok je lahko pomankanje prisotnosti zadostne količine kisika v tumorju, kar je pogosto posledica slabe angiogeneze in zato slabe prekravavitve tumorja. Zaradi tega je v tumorskem okolju nizka raven glukoze in piruvata, medtem ko je prisotna visoka koncentracija laktata ter drugih intermediatov glikolize, kar povzroči znižanje pH. Posledično se naštete spremembe lahko odražajo v spremembi tamkajšnje mikrobiote (Hirayama in sod., 2009).

2.3.3.2 Alfa bakterije

Za opredelitev vloge mikrobiote v razvoju kolorektalnega raka sta Sears in Pardoll (2011) uvedla hipotezo »alfa bakterij«, pri čemer lahko določeni člani mikrobiote le-to preoblikujejo tako, da nastali vnetni imunski odziv in transformacija epitelijskih celic debelega črevesa vodita v nastanek raka. Nekateri predstavniki mikrobiote niso le neposredno proonkogeni, ampak so zmožni preoblikovati črevesno mikrobioto v takšno, ki krepi in še naprej spodbuja njihovo rast in indukcijo imunskega odgovora sluznice ter povzroča spremembe epitelijskih celic debelega črevesa. Poleg tega lahko ti mikrobi okrepijo kancerogenezo s selektivnim izrivanjem ostalih mikrobnih vrst. Vse skupaj nato vodi v nastanek kolorektalnega raka (Sears in Pardoll, 2011). Primer takšnih bakterij so enterotoksigeni sevi *Bacteroides fragilis* (ETBF), ki proizvajajo toksin fragilizin (BFT; angl. *Bacteroides fragilis* toxin) (Toprak in sod., 2006). Poleg tega, da je ta toksin neposredno genotoksičen za celice debelega epitela, v njih stimulira cepitev tumor zaviralnega proteina E-kadherina, kar povzroči celično proliferacijo ter povečanje prepustnosti črevesne pregrade (Wu in sod., 2007). Tudi stalna kolonizacija debelega črevesa z bakterijami iz družine enterobakterij, kot so *Shigella*, *Citrobacter* in *Salmonella* spp., lahko izzove kronični imunski odziv in posledično razvoj kolorektalnega raka (DuPont, 2009).

2.3.3.3 Bakterijski »vozniki« in »potniki« razvoja kolorektalnega raka

Model bakterijskih »voznikov« in »potnikov« razvoja kolorektalnega raka prav tako opisuje vlogo posameznih bakterijskih vrst pri razvoju kolorektalnega raka. Za razliko od modela »alfa bakterij«, se bakterije, ki povzročijo začetek razvoja kolorektalnega raka, v tem modelu imenujejo »bakterijski vozniki kolorektalnega raka« (Tjalsma in sod., 2012). Ta model predpostavlja, da se zaradi sprožene kancerogeneze nato vzpostavijo bakterijske niše (Hirayama in sod., 2009), kjer so določene oportunistične bakterije sposobne rasti hitreje in jih imenujemo »bakterijski potniki kolorektalnega raka«. Te bakterije naj ne bi povzročile razvoja kolorektalnega raka, ampak se tam razrastejo šele takrat, ko se spremeni okolje v bližini tumorsko spremenjene črevesne sluznice in tako izpodrinejo prvotno razraščene bakterije, ki so povzročile mutacije v genomih rakavih celic (Tjalsma in sod., 2012). Opazno zmanjšanje oziroma izginotje bakterijskih vrst, ki jih definiramo kot bakterijske »voznike«, se pojavi pri napredovanju raka želodca, kjer pride do izginotja bakterije *H. pylori* (Kang in sod., 2006). Tako imajo bakterijski »vozniki« in »potniki« različno časovno obdobje razrasti v tumorskem okolju in posledično naj bi bile ločene tudi njihove vloge v patogenezi kolorektalnega raka (Slika 3) (Tjalsma in sod., 2012).



Slika 3: Model bakterijskih »voznikov« in »potnikov« razvoja kolorektalnega raka (Tjalsma in sod., 2012).

Marchesi in sodelavci (2011) so v tumorskem tkivu, v primerjavi z zdravim tkivom, zaznali zmanjšanje prisotnosti rodov iz družine enterobakterij, kot so *Citrobacter*, *Shigella*, *Cronobacter*, *Kluyvera*, *Serratia* in *Salmonella* spp., kar nakazuje, da so te bakterije del mikrobiote bolnikov s kolorektalnim rakom, vendar jih med napredovanjem bolezni prerastejo zgoraj omenjene komenzalne bakterije iz rodov *Coriobacteridae*, *Roseburia*, *Fusobacterium* in *Faecalibacterium*. Na podlagi teh študij se zdi, da so najpogosteji »bakterijski potniki«, ki kolonizirajo tkivo, kjer se razvije kolorektalni rak, bakterije iz rodu *Fusobacterium*. Ni še jasno, ali imajo ti po Gramu negativni oportunistični patogeni le koristi od tumorsko spremenjenega tkiva ali imajo aktivno vlogo pri razvoju bolezni (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011).

2.4 FUZOBAKTERIJE

2.4.1 *Fusobacterium nucleatum*

Fuziformne organizme² (angl. fusiform organisms) je v vzorcih zobne gnilobe prvi opazil van Leeuwenhoek (1693). Leta 1894 jih je v vzorcih lezij akutnega nekrotizirajočega ulceroznega gingivitisa odkril Plaut in dve leti kasneje v vzorcih Vincentove angine še Vincent. Kot prva sta leta 1898 fuziformne organizme v čisti kulturi izolirala Veillon in Zuber ter jim poimenovala *Bacillus fusiformis*. Leta 1922 je Knorr predlagal ime rodu *Fusobacterium* ter opisal tri vrste: *F. plauti-vincentii*, *F. nucleatum* in *F. polymorphum*, ki so jih leta 1974 združili v eno vrsto z imenom *F. nucleatum* (Dzink in sod., 1990). Danes fuzobakterije uvrščamo v lastno deblo *Fusobacteria*. Rod *Fusobacterium* vsebuje naslednje vrste: *F. alocis*, *F. canifelinum*, *F. equinum*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. perfoetens*, *F. periodonticum*, *F. plautii*, *F. polysaccharolyticum*, *F. prausnitzi*, *F. pseudonecrophorum*, *F. russii*, *F. simiae*, *F. sulci*, *F. ulcerans* in *F. varium* (Euzéby, 1997).

Bakterije iz rodu *Fusobacterium* so po Gramu negativni, negiblivi in nesporogeni striktni anaerobi. Imajo značilno obliko rahlo ukrivljenih palč s koničastimi konci, ki so pogosto zadebeljene na sredini. Merijo 0,4-0,7 µm v širino in 3-10 µm v dolžino (Moore in sod., 1984). Glavni končni produkt njihovega metabolizma predstavlja ocetna kislina ter maslena kislina (Lawson in sod., 1989). Vsebnost gvanina in citozina (G + C) v genomu med različnimi vrstami se giblje med 26 in 52 mol % (Moore in sod., 1984).

F. nucleatum prvotno najdemo v ustni votlini ljudi in živali, kjer ima pomembno vlogo pri parodontalnih boleznih. Vrsta *F. nucleatum* ima 5 podvrst: *F. nucleatum* subsp. *animalis*, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* in *F. nucleatum* subsp. *vincentii* (Euzéby, 1997). Tipski sev predstavlja *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (ATCC 25586, DSM 15643). Genom tipskega seva je velik 2,17 Mb, medtem ko vsebnost G + C znaša 27 mol % (Kapatral in sod., 2002). Na krvnem agarju tvorijo bakterije tipskega seva 1-2 mm velike, okrogle, izbočene in navadno nehemolitične kolonije. V tekočem gojišču z glukozo zrastejo v obliki

² Fuziformen: vretenaste oblike, zaokrožen, se oži od sredine proti vsakem koncu.

kosmičastega oziroma zrnatnega sedimenta ter z značilnim močnim smradom (Moore in sod., 1984).

Zaradi adhezivnih sposobnosti *F. nucleatum* predstavlja »most« med zgodnjimi in poznnimi kolonizatorji biofilma zobne gnilobe (Kolenbrander in sod., 2006). Večina raziskav o bakteriji *F. nucleatum* se osredotoča na preučevanje njene vloge pri gingivitisu in periodontitisu. Poleg tega ima ta bakterijska vrsta sposobnost vdora v epitelijske celice ustne votline in povzročanja vnetja (Han in sod., 2000). Do danes jo povezujemo s številnimi boleznimi. Izolirana je bila iz različnih vnetnih mest: sinusitis, endokarditis, septični artritis, tonsilitis (vnetje mandljev) ter ognojkov možganov, kože in jeter. *F. nucleatum* so odkrili tudi v okužbah pljuč in sečil, zaradi invazije v plodovnico med nosečnostjo, lahko povzroči prezgodnji porod ali pa mrtvorojenost (Marina in sod., 1993; Shammas in sod., 1993; Brook in Leyva, 1994; Roberts, 2000).

Do nedavnega je veljalo, da so bakterije *F. nucleatum* primarno del ustne mikrobiote ljudi in jih v prebavnem traktu najdemo samo občasno. Da je temu tako, so sklepali na osnovi rezultatov gojenja bakterij iz vzorcev človeškega blata. Na ta način pogosto niso zaznali velikega števila živih fuzobakterijskih celic, ki so kolonizirale sluznico črevesa (Allen-Vercoe in sod., 2011), medtem ko je bilo z metodo FISH (angl. fluorescence *in situ* hybridization) možno opaziti povezavo med invazivnimi bakterijami rodu *Fusobacterium* (vključno s *F. nucleatum*) in vnetim tkivom slepiča (Swidsinski in sod., 2011). Slednje nakazuje, da so bile bakterije rodu *Fusobacterium* dolgo časa spregledan del mikrobiote debelega črevesa, ki lahko zaradi svojih vnetnih in invazivnih funkcij sodeluje tudi pri razvoju vnetnih črevesnih bolezni in posledično razvoju kolorektalnega raka.

2.4.2 Fuzobakterije in kolorektalni rak

Leta 2011 so tri neodvisne skupine poročale o raznolikosti v sestavi mikrobne združbe, pri bolnikih s kolorektalnim rakom. Analize so bile izvedene na bioptih črevesne sluznice, ki so jih odvzeli v poznih fazah razvoja tumorja. Ti vzorci so bili tumorsko tkivo, odvzeto iz mesta tumorja in okoliško pregledano zdravo tkivo. Pri delu so uporabili različne molekularne tehnike ugotavljanja nukleotidnega zaporedja mikrobne DNK in RNK, striktno anaerobne gojitvene tehnike in citološke analize vzorcev. Najbolj očitna podobnost med opisanimi mikrobnimi združbami v teh študijah je značilen porast števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v sluznici debelega črevesa, glede na to ali gre za rakovo spremenjen ali za zdrav del debelega črevesa (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011; Marchesi in sod., 2011). Poleg povečanja bakterij iz rodu *Fusobacterium*, je bilo vidno značilno zmanjšanje števila predstavnikov bakterijskih debel *Bacteroidetes* in *Firmicutes* in znotraj tega debla razreda *Clostridia*, katerih številčnost je višja v zdravih delih debelega črevesa (Kostic in sod., 2011). Castellarin in sodelavci (2011) so pokazali, da je sekvenca, ki je bila za tumorsko okolje značilno povečana, podobna sekvenci bakterije *Fusobacterium nucleatum* subs. *nucleatum* (ATCC 25586, DSM 15643). Nadalje so iz bolnikov s kolorektalnim rakom uspeli izolirati sev fuzobakterij in s histološko analizo celične linije debelo-črevesnega adenokarcinoma dokazati njegovo invazivnost. To nakazuje, da lahko te bakterije vdirajo v

tumorske celice in posledično z metastazami potujejo po telesu, ne da bi jih imunski sistem prepoznał in uničil (Castellarin in sod., 2011).

Opravljenih je bilo še več študij, s katerimi so prav tako potrdili porast števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v fecesu bolnikov s kolorektalnim rakom (Ahn in sod., 2013) ter v bioptih tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa (Tahara in sod., 2014), kot tudi v adenomih debelega črevesa (McCoy in sod., 2013). Tahara in sodelavci (2014) so preučevali tudi povezavo bakterij iz rodu *Fusobacterium* z različnimi tipi mutacij in epigenetskih sprememb preiskovanih tumorjev, kot so CIMP, MSI in mutacije v genih *k-ras* ter *tp53*. Pokazali so povezavo med povečano količino fuzobakterij in gensko okvaro CIMP ($P=0,001$) ter MSI ($P=0,018$) (Tahara in sod., 2014). Pri ugotavljanju števila vseh bakterij iz rodu *Fusobacterium*, kot tudi samo bakterij *F. nucleatum*, so pokazali, da trend spremenjanja števila fuzobakterij sovpada trendu spremenjanja števila bakterij *F. nucleatum* in to tako v tumorskem, kot tudi v zdravem tkivu (Tahara in sod., 2014).

V nasprotju s predpostavko o »bakterijskih potnikih razvoja kolorektalnega raka« (Tjalsma in sod., 2012), so Tahara in sodelavci (2014) pripisali bakterijam iz rodu *Fusobacterium* patogeno vlogo pri razvoju kolorektalnega raka. To utemeljujejo z ugotovitvami, (i) da lahko fuzobakterije zaznamo tako v vzorcih tumorskega in okoliškega zdravega tkiva, kot tudi pri zdravih ljudeh, (ii) visoko število fuzobakterij v zdravi sluznici lahko predvidimo glede na molekularni profil tumorja in (iii) bolniki s povišanim številom fuzobakterij imajo specifičen molekularni profil tumorjev (Tahara in sod., 2014). Na vlogo fuzobakterij pri kancerogenezi nakazuje tudi povišano število teh bakterij v okolini adenomov oziroma polipov, ki nastanejo v prvih fazah razvoja kolorektalnega raka (Kostic in sod., 2013; McCoy in sod., 2013).

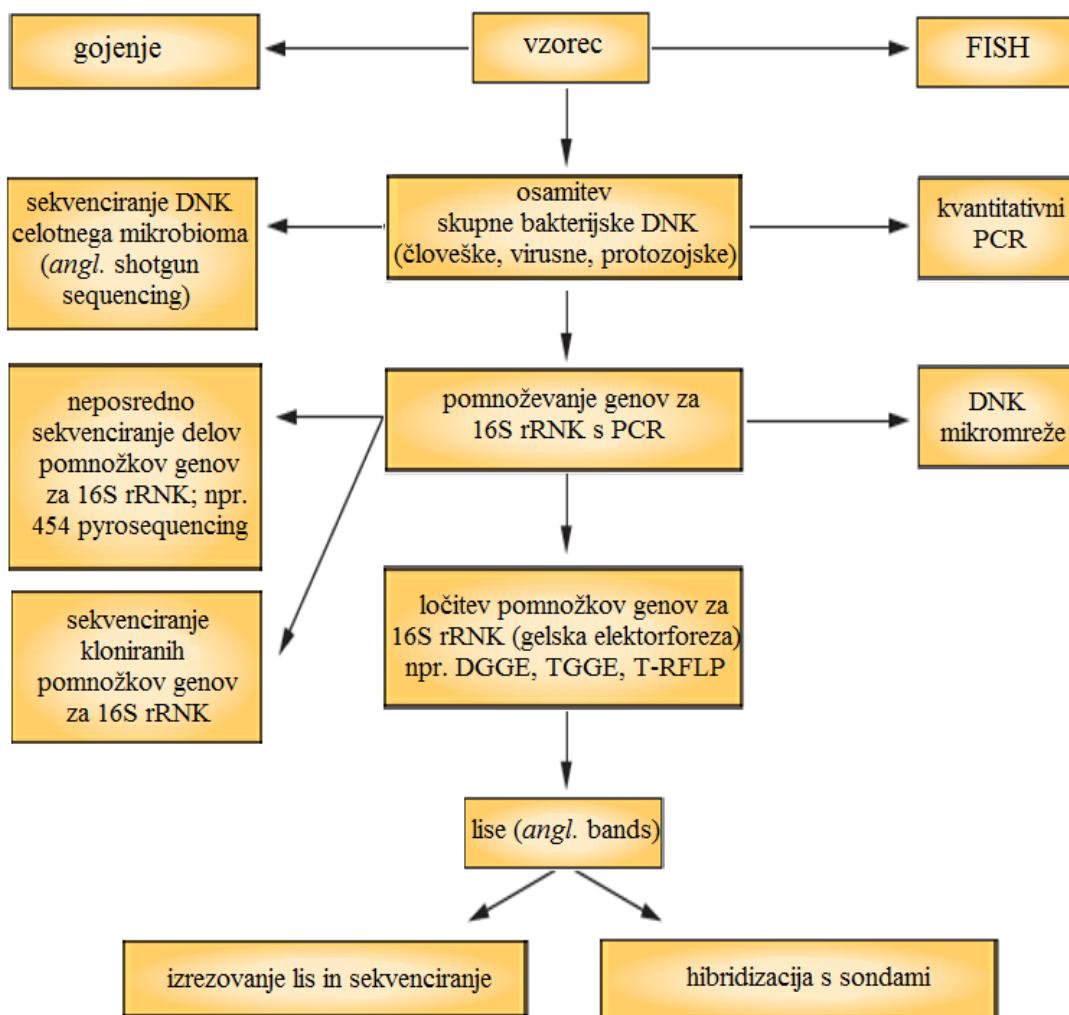
V dveh študijah so Kostic in sodelavci (2013) ter Rubinstein in sodelavci (2013) predstavili mehanizem delovanja *F. nucleatum* pri razvoju kolorektalnega raka. V in vivo testih se je pri v debelem črevesu s *F. nucleatum* okuženih APC miših³ pojavilo večje število tumorjev kot pri kontrolnih miših. Prav tako je v okolini adenomov poskusnih miši prišlo do močnejšega vnetja zaradi večje infiltracije mieloičnih imunskih celic (monociti, makrofagi, granulociti) in ostalih vnetnih markerjev (COX-2, IL-8, IL-6 in TNF- α) (Kostic in sod., 2013). Tudi Rubinstein in sodelavci (2013) so potrdili vnetni in kancerogeni vpliv *F. nucleatum* pri razvoju kolorektalnega raka. Glavno vlogo pri patogenezi so pripisali FadA proteinu, ki se nahaja na njeni površini. S pomočjo FadA se *F. nucleatum* veže na transmembranski protein E-kadherin epitelijskih celic, kar omogoči vdor bakterije v epitelijske celice. Nadalje pride v epitelijski celici do aktivacije β -katenina in posledično aktivacije vnetnih in onkogenih signalov, kot je izražanje transkripcijskih faktorjev, onkogenov ter vnetnih markerjev, ki skupaj sprožijo razvoj kolorektalnega raka (Rubinstein in sod., 2013). Avtorji obeh študij so pokazali, da *F. nucleatum* povzroči razvoj kolorektalnega raka v celičnih linijah in miših z okvaro v genu *apc*. Slednje nakazuje, da je za začetek razvoja kolorektalnega raka še vedno potrebna okvara tega gena in posledični razvoj adenomov v debelem črevesu, ter da se bakterije iz rodu *Fusobacterium* šele nato priključijo razvoju kolorektalnega raka (Keku in sod., 2013). Tako navkljub pokazanem še

³ APC miš: z mutacijo v genu APC.

vedno obstaja odprto vprašanje ali bakterije iz rodu *Fusobacterium*, vključno s *F. nucleatum*, v celoti povzročijo razvoj kolorektalnega raka ali je njihov razrast v tumorskem tkivu posledica vplivov spremenjenega tumorskega okolja.

2.5 METODE OPREDELJEVANJA ČREVESNE MIKROBIOTE

Danes poznamo več metod za opredelitev črevesne mikrobiote, ki jih v grobem delimo na »tradicionalne« in »molekularne«. Med tradicionalne metode štejemo tiste, ki vključujejo gojenje. Primer takšnih metod sta štetje kolonij na trdnem (selektivnem) gojišču in metoda najverjetnejšega števila celic MPN (angl. most probable number). Poleg tega, da moramo pri delu poznati rastne zahteve mikroorganizma, ki ga gojimo, je glavna slabost teh metod anomalija števnih plošč (angl. Great plate count anomaly). Na gojiščih namreč zraste le med 0,01 do 10 % vseh prisotnih celic v mikrobnem vzorcu (Amann in sod., 1995). Zaradi tega danes pri ugotavljanju sestave mikrobiote in števila posameznih mikrobov v črevesu uporabljamo različne molekularne metode, ki so na kratko opisane v nadaljevanju (Slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz metod za opredeljevanje črevesne mikrobiote (Fraher in sod., 2012).

2.5.1 Hibridizacija *in situ*

Hibridizacija *in situ* omogoča prepoznavanje posameznih mikrobnih celic in s tem filogenetsko identifikacijo. Temelji na hibridizaciji kratkega fluorescentno označenega oligonukleotida s komplementarno sekvenco v rRNK. Fluorescentne celice lahko opazujemo z epifluorescenčnim mikroskopom, konfokalnim mikroskopom ali pretočnim citometrom. Metoda je zelo razširjena v mikrobnii ekologiji in znana pod imenom FISH (*angl. fluorescent in situ hybridization*) (Amann in sod., 1995). Slabost metode je, da ne omogoča odkrivanja še neznanih oziroma neopisanih mikroorganizmov in je bolj primerna za sledenje enega ali nekaj tarčnih mikroorganizmov kot za ugotavljanje strukture mikrobiote.

2.5.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta (DGGE)

DGGE (*angl. denaturing gradient gel electrophoresis*) je elektroforetska metoda, ki jo največkrat uporabljam za oceno razlik v sestavi mikrobiote med primerjanimi vzorci, saj omogoča ločevanje med različnimi mikrobnimi vrstami na osnovi razlik v zaporedju DNK. Zaradi teh razlik pride do različne elektroforetske mobilnosti delno denaturirane dvostranske molekule DNK (dsDNA) v poliakrilamidnem gelu z linearnim gradientom denaturanta. Večja kot je vsebnost parov GC (gvanidin, citozin), bolj je molekula dsDNA odporna na denaturacijo in kot tako se bo razklenila ter posledično ustavila pri višji koncentraciji denaturanta. To na gelu vidimo v obliki lise (*angl. band*) (Fischer in Lerman, 1983). Z uporabo začetnih oligonukleotidov z »GC-čeljustmi« poskrbimo, da se dsDNA ne razgradi do konca in tako ne potuje kot enoverižna molekula DNA (ssDNA) (Muyzer in Smalla, 1998). Nadalje lahko iz DGGE gela izrežemo določene lise, s PCR ponovno pomnožimo tam prisotno DNA in s pomočjo sekvenciranja izvedemo filogenetsko identifikacijo. Podobno kot DGGE, tudi TGGE (*angl. temperature gradient gel electrophoresis*) omogoča ocenitev sestave mikrobiote, le da v tem primeru namesto gradiента denaturanta med potekom analize višamo temperaturo (Muyzer in Smalla, 1998).

2.5.3 Restriktijski polimorfizem dolžine končnih fragmentov (TRFLP)

TRFLP (*angl. Terminal restriction fragment length polymorphism*) tako kot DGGE in TGGE omogoča oceno sestave mikrobiote v vzorcu. Metoda omogoča ločevanje med različnimi mikrobiotami na podlagi spremeljanja velikosti terminalnih restriktijskih DNA fragmentov. Metodo izvedemo tako, da tarčno DNA ob pomnoževanju z metodo PCR na 5' koncu označimo s fluorokromom in po restrikciji z endonukleazo ločimo s kapilarno elektroforezo (Osborn in sod., 2000).

2.5.4 DNK mikromreže

Metoda omogoča filogenetsko identifikacijo črevesne mikrobiote in se uporablja za primerjavo sestave mikrobiote med različnimi populacijami. Princip metode temelji na oligonukleotidnih sondah, ki so pritrjene na stekleni ploščici. Ko na ploščo dodamo fluorescentno označene pomnožke tarčne DNK, pride do hibridizacije med pomnožki in specifičnimi sondami. Fluorescenco vezanih pomnožkov nato spremljamo z laserjem (Palmer in sod., 2006).

2.5.5 PCR v realnem času (qPCR)

Je kvantitativna metoda, ki omogoča identifikacijo že poznanih bakterijskih vrst oziroma višjih taksonomskeh skupin in oceno števila bakterij v vzorcih. Princip metode je podoben običajnemu PCR, le da je pri qPCR dodano fluorogeno označevanje začetnih oligonukleotidov, sond ali pomnožkov. Slednje omogoča sprotno spremljanje poteka reakcije. Povečanje količine DNK pomnožka spremljamo kot povečanje fluorescentnega signala, ki ga zaznamo z detektorji v qPCR napravi (Mackay, 2004). Količino sproščene fluorescence prikažemo grafično v odvisnosti od števila ciklov PCR in glede na potek rasti izmerjene fluorescence določimo cikel, kjer je reakcija prešla prag zaznave. Ta točka (C_T) je odvisna od začetne količine tarčne DNK. Količino tarčne DNK v vzorcu kvantificiramo glede na standardno krivuljo, ki jo izrišemo na podlagi pomnoževanja standarda z znano količino tarčne DNK (Carey in sod., 2007).

Pri tipu qPCR, kjer označujemo nastale pomnožke, je fluorescentni reporter nespecifično barvilo, ki interkalira v dvojno vijačnico (dsDNA). Primer takega barvila je SYBR Green, ki začne fluorescirati, kadar je vezan v dsDNA. Pri poteku qPCR polimeraza pomnožuje tarčno DNA in pri tem nastaja čedalje več dsDNA molekul. V te nastale molekule se veže več barvila in posledično se poveča fluorescensa. Barvilo SYBR Green se veže nespecifično v vse dsDNA molekule, zato moramo na koncu qPCR metode preveriti, ali so nastali le specifični produkti. To preverimo s talilno krivuljo (*angl. melting curve*). Pri tej metodi višamo temperaturo in spremljamo razpad v qPCR nastalih dsDNA molekul na enoverižne DNA molekule (ssDNA). Pri razpadu dsDNA se vezano barvilo sprosti in fluorescensa ugasne. V primeru, da je pri qPCR nastal le specifičen produkt, bo zaradi iste bazne sestave imel enako temperaturo taljenja (T_m ; *angl. melting temperature*) in posledično bodo vse dsDNA razpadle pri isti temperaturi, kar bo na krivulji vidno v obliki enega vrha (Mackay, 2004).

Pri drugem tipu qPCR nastanek specifičnih produktov spremljamo z uporabo tretjega oligonukleotida. Gre za specifično oligonukleotidno sondu (*angl. Taqman probe*), ki nalega na tarčno DNA v območju znotraj naleganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov. Značilnost sonde je, da ima na 5'-koncu pritrjen fluorokrom in na 3'-koncu dušilec (*angl. quencher*). Bližina dušilca na sondi omejuje fluorescenco, ki jo oddaja fluorokrom. Med potekom qPCR polimeraza pomnožuje tarčno DNA. Ko pride do mesta, kjer je vezana sonda, s 5'eksonukleazno aktivnostjo odcepi nukleotide sonde, ki so vezani na tarčno DNA. Pri tem pride do sprostitev tako fluorokroma, kot tudi dušilca. Ker sedaj fluorokrom in

dušilec nista več skupaj, se fluorescenza poveča in ta signal merimo (Heid in sod., 1996; Mackay, 2004). Zaradi specifične vezave sonde na tarčno DNK ni potrebno narediti talilne krivulje.

2.5.6 Sekvenciranje

S to metodo ugotavljamо nukleotidno zaporedje DNK molekul in predstavlja zlati standard karakterizacije črevesne mikrobiote. Začetke sekvenciranja so predstavili Frederick Sanger in sodelavci (1977). Kot izboljšava te metode se pojavljajo metode sekvenciranja »naslednje generacije«. Glavna prednost teh metod je, da za sekvenciranje ne potrebujemo klonirane DNK, kot pri metodi po Sangerju, ampak lahko neposredno ugotavljamо nukleotidno zaporedje skupne DNK mikrobne združbe. Primer takšnih metod so komercialna tehnologija pirosekvenciranja: 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GMBH Ltd, Mannheim, Nemčija), Illumina® (Illumina, San Diego, CA, ZDA) in SOLiD™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, ZDA). Poleg tega, da s sekvenciranjem filogenetsko identificiramo in kvantificiramo preiskovano mikrobioto, lahko odkrijemo tudi tiste bakterije, ki so še nepoznane ali pa so v vzorcih prisotne v zelo majhnih količinah (Voelkerding in sod., 2009).

3 MATERIAL IN METODE

V tem poglavju so navedeni material in metode, ki smo jih uporabili med eksperimentalnim delom naloge.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci in mikroorganizmi

Med optimizacijo metod za osamitev mikrobne DNK in PCR, DGGE ter qPCR smo uporabljali vzorce sluznice kunčjega debelega črevesa in fecesa ter čisto kulturo bakterij *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (DSM 15643).

Vzorce črevesnih sluznic in črevesnih vsebin pacientov, ki smo jih obravnavali pri nalogi, smo pridobili iz Kliničnega oddelka za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (UKC) v okviru sodelovanja s skupino prof. dr. Boruta Štabuca. Pridobili smo vzorce, ki so bili odvzeti med preiskavami ob sumu na pojav sprememb črevesne sluznice oziroma ob rutinskih kontrolnih preiskavah. Skupaj z vzorci smo pridobili tudi podatke, ki so vključevali diagnostično oceno odvzetih vzorcev po sami endoskopski kolonoskopiji in po histološki analizi. Seznami vzorcev posameznega pacienta so v prilogah (Priloga A-R).

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo bakterijski sev *F. nucleatum* gojili na modificiranem gojišču 104. PYG (DSMZ, 2009).

Preglednica 1: Sestava gojišča 104. PYG (DSMZ, 2009) za gojenje anaerobnih bakterij *F. nucleatum*.

Sestavina	Koncentracija v raztopini	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
triptikazni pepton		5 g/l	Biolife, Italija
pepton		5 g/l	Biolife, Italija
kvasni izvleček		10 g/l	Biolife, Italija
goveji izvleček		5 g/l	Biolife, Italija
glukoza		5 g/l	Kemika, Hrvaška
K ₂ HPO ₄		2 g/l	Kemika, Hrvaška
Tween 80		0,1 vol. %	Merck, Nemčija
cistein-HCl × H ₂ O		0,5 g/l	Merck, Nemčija
resazurin		1 mg/l	Fluka, Švica
solna raztopina		4 vol. %	
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,25 g/l		Kemika, Hrvaška
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,5 g/l		Merck, Nemčija
K ₂ HPO ₄	1 g/l		Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	1 g/l		Kemika, Hrvaška
NaHCO ₃	10 g/l		Merck, Nemčija
NaCl	2 g/l		Merck, Nemčija
raztopina hemina		1 vol. %	
hemin	0,5 g/l		Sigma-Aldrich, ZDA
1N NaOH	10 ml/l		Merck, Nemčija
vitamin K1		0,02 vol. %	
vitamin K1	5 ml/l		Sigma-Aldrich, ZDA
95 % etanol	99,5 vol %		Sigma-Aldrich, ZDA
destilirana voda		94,88 vol. %	
agar (poltrdno gojišče)		0,7 ut. %	Biolife, Italija

Za pripravo tekočega gojišča PYG smo zgoraj navedene sestavine, razen hemina, vitamina K in cisteina, raztopili v deionizirani vodi, segreli do vrenja in pustili vreti 5 minut. Odstavljenemu gojišču smo dodali cistein, gojišče še enkrat zavreli, nato pa ohladili do sobne temperature ter dodali hemin in vitamin K. Z dodajanjem 8 N NaOH smo uravnali pH gojišča na 7,2 ter začeli prepihovati z N₂, da je gojišče izgubilo rožnato barvo. Med pripravo smo gojišče ves čas mešali z magnetnim mešalom. Za pripravo poltrdrega gojišča smo dodali 0,7 ut. % agarja. Pod zaščitnim plinom N₂ smo po 7,5 ml gojišča aseptično alikvotirali v 15 mililitrske plinotesne epruvete, t.i. Hungatove epruvete in gojišča toplotno sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min, 1,1 bar).

3.1.3 Kemikalije

- absolutni alkohol (Sigma-Aldrich, ZDA)
- APS, amonijev persulfat (Sigma-Aldrich, ZDA)
- barvili za DNK:
 - SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Velika Britanija)
 - etidijev bromid - EtBr (Sigma-Aldrich, ZDA)
- borova (V) kislina (H_3BO_3) (Merck, Nemčija)
- CTAB - heksadeciltrimetil amonijev bromid (Sigma-Aldrich, ZDA)
- formamid (Fluka, Švica)
- dNTP mix – mešanica deoksiribonukleotidov za PCR #R0249 (Thermo Scientific, ZDA)
- EDTA, etilendiaminotetraocetna kislina, pH 8,0 (Merck, Nemčija)
- etanol (Merck, Nemčija)
- fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1), pH 8,0 (Calbiochem, ZDA)
- izopropanol (Merck, Nemčija)
- kemex (Kemika, Hrvaska)
- kloroform (Merck, Nemčija)
- kompleti za osamitev mikrobne DNK: SmartHelix™ DNAid (Sekvenator, Slovenija), ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction Kit (Epicentre, ZDA) in QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Nemčija)
- mešanica akrilamida in bisakrilamida z razmerjem 37:1 (Sigma-Aldrich, ZDA)
- mešanici za qPCR: KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, ZDA) in TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Applied biosystem, ZDA)
- natrijev klorid - NaCl (Merck, Nemčija)
- ocetna kislina - CH_3COOH , 96 % (Merck, Nemčija)
- začetni oligonukleotidi (Microsynth, Švica) (Preglednica 3)
- polimeraza *Taq* #EP0282 (Thermo Scientific, ZDA)
- proteinaza K (Thermo Scientific, ZDA)
- Sea Kem LE agarosa (Lonza, ZDA)
- TEMED oziroma N,N,N',N' - tetrametilendiamin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- urea (Merck, Nemčija)
- velikostni standard GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, ZDA)
- voda brez nukleaz (Sigma-Aldrich, ZDA)

3.1.4 Pufri in raztopine

Preglednica 2: Sestava uporabljenih pufrov in raztopin.

Pufer/Raztopina	Sestava	Proizvajalec
CTAB/NaCl	10 ut. % CTAB 0,7 M NaCl	Sigma-Aldrich, ZDA Merck, Nemčija
TAE	40 mM Tris 20 mM CH ₃ COOH 1 mM EDTA	Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija
TBE	0,045 M Tris 0,045 M H ₃ BO ₃ 1 mM EDTA	Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija
TE	10mM Tris-HCl 1mM EDTA	Merck, Nemčija Merck, Nemčija
LB* za agarozni gel	0,25 vol. % bromfenol modro 0,25 vol. % ksilen cianol 40 ut. % saharoze	Serva, Nemčija Sigma-Aldrich, ZDA Kemika, Hrvaška
LB* za DGGE	0,05 vol.% bromfenol modro 0,05 vol. % ksilen cianol 70 vol. % glicerol	Serva, Nemčija Sigma-Aldrich, ZDA Sigma-Aldrich, ZDA
Ekstrakcijski pufer**	100mM Tris-HCL, pH 8 10mM EDTA 100mM NaCl 2 % SDS 50mM ditiotreitol	Sigma-Aldrich, ZDA Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija Sigma-Aldrich, ZDA
10 % formalin, pH 7,0	3,5 vol. % formaldehid 36 % 0,65 ut. % Na ₂ HPO ₄ 0,4 ut. % Na ₂ H ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	Kemika, Hrvaška Merck, Nemčija Merck, Nemčija

* LB (*angl. loading buffer*) - nalagalni pufer

** Ekstrakcijski pufer (Rodriguez in sod., 2002)

3.1.5 Začetni oligonukleotidi

V verižnih reakcijah s polimerazo (PCR) smo uporabili spodaj navedene začetne oligonukleotide (Preglednica 3).

Preglednica 3: Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

Oznaka	Nukleotidno zaporedje 5'→3'	Tarčno mesto*	Dolžina pomnožka	Specifičnost	Namen	Uporaba**	Vir
Eub 338f	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	338-358	588 bp	Bakterijski univerzalni	Preverjanje uspešnosti osamitve bakterijske DNK	F	Lane, 1991
926r	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	907-926		Bakterijski univerzalni		R	Amann in sod., 1995
HDA1-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	338-359	200 bp	Bakterijski univerzalni	DGGE	F	Walter in sod., 2000
HDA2	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	539-561		Bakterijski univerzalni		R	
Eub 338f	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	338-358	180 bp	Bakterijski univerzalni	qPCR SYBR GREEN	F	Lane, 1991
Eub 518r	ATT ACC GCG GCT GCT GG	518-534		Bakterijski univerzalni		R	Muyzer in sod., 1993
Boutaga F	GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	557-576		<i>Fusobacterium</i> spp.		F	
Boutaga R	GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA	697-720	163 bp	<i>Fusobacterium</i> spp.	qPCR TaqMan	R	Boutaga in sod., 2005
Boutaga TM	FAM-CTC TAC ACT TGT AGT TCC G-TAMRA	672-670		<i>Fusobacterium</i> spp.		S	

* po *E.coli*

** F -kot forward (k 3' koncu obrnjen) začetni oligonukleotid, R -kot reverse (k 5' koncu obrnjen) začetni oligonukleotid, S -kot sonda

3.1.6 Laboratorijska oprema

- avtoklav A-21CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- centrifuga s hlajenjem: MIKRO 200R (Hettich, Nemčija)
- centrifuga za qPCR ploščice: CENTRIC 322A (Tehtnica, Slovenija)
- centrifuga: MINI SPIN PLUS (Eppendorf, Nemčija)
- DGGE sistem: D GENETM Denaturating Gel Electrophoresis System, (Bio-Rad, ZDA)
- digestorij
- elektroforezna kad: MINI-SUB ter WIDE MINI-SUB CELL GT, (Bio-Rad, ZDA)
- hladilnik
- Hungate epruvete (Bellco, ZDA)
- komora 37 °C (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- komora za pripravo PCR mešanic: DNK in RNK FREE CHAMBER (Biosan, Latvija)
- kroglični razbijalec: Mini-BeadbeaterTM (BioSpec, ZDA)
- laminarij (Scholzen Technik, Nemčija)
- magnetno mešalo
- mikroskop: Olympus BX50 (Olympus, Japonska)
- mikrovalovna pečica
- napajalnik: POWER PAC (Bio-Rad, ZDA)
- naprava za fotografiranje v UV spektru: Gel Doc 1000 (Bio-Rad, ZDA)
- naprava za PCR: ciklični termostat MyCyclerTM Thermal Cycler (Bio-Rad, ZDA)
- naprava za qPCR: ViiA 7.0 (Applied biosystem, ZDA)
- pH-meter (Eutech, Singapur)
- plinski gorilnik
- polavtomatske pipete: Finnpipette (Thermo Scientific, ZDA)
- ultrazvočni razbijalec: Soniprep 150 (MSE, Velika Britanija)
- spektrofotometer: Novaspec II (Biochrom, Velika Britanija)
- spektrofotometer za DNK: NanoVueTM (GE Healthcare, ZDA)
- števna komora: Improved Neubauer (Laboroptik, Velika Britanija)

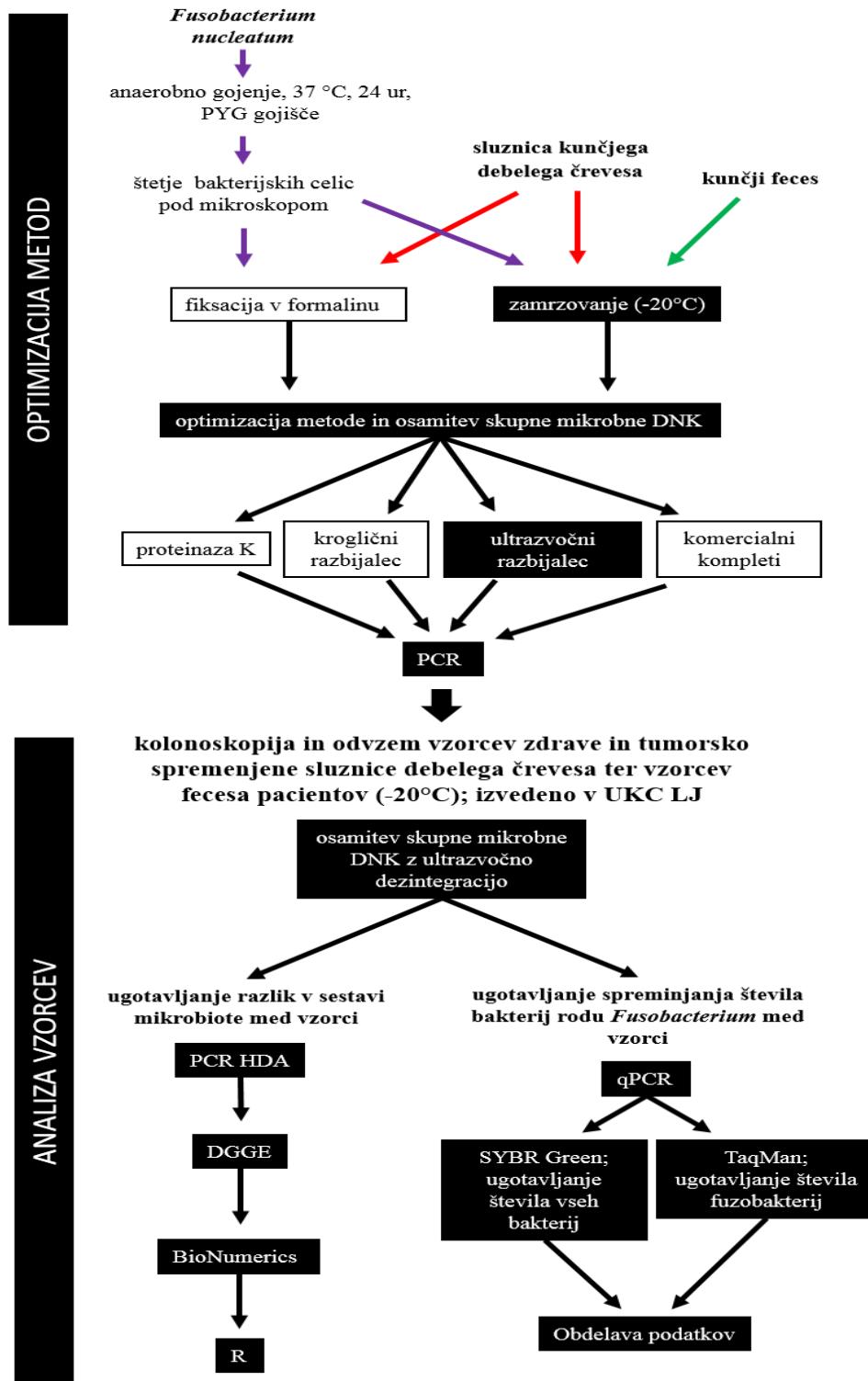
- tehtnica: PN163 in P1210 (Mettler Toledo, Slovenija)
- termoblok za mikrocentrifugirke: CH-100 BIOSAN (Chemas d.o.o., Slovenija)
- UV-transluminator: ChemiGenious² Bio-Imaging Gel Doc System (Syngene, Velika Britanija)
- vrtinčno mešalo: VORTEX-GENIE 2 (Scientific Industries, ZDA)
- zamrzovalnik

3.1.7 Računalniški programi

- računalniški program za slikanje DGGE gelov: GeneSnap (Syngene, Velika Britanija)
- računalniški program za statistično obdelavo DGGE gelov: BioNumerics (Applied Maths, Belgija)
- računalniški program za ovrednotenje rezultatov qPCR: ViiATM 7 Software, Version 1.2.1 (Applied biosystem, ZDA)
- računalniški program Microsoft Office Excel (Microsoft, ZDA)
- računalniški program za delo z GEL DOC 1000: MOLECULAR ANALYST SOFTWARE Version 1.5 (Bio-Rad, ZDA)
- računalniški program za statistično obdelavo podatkov SPSS[®] Statistic Version 20 (IBM, ZDA)

3.2 METODE

3.2.1 Shema dela



Slika 5: Shema dela.

3.2.2 Priprava vzorcev sluznice in vsebine debelega črevesa

Kunčje debelo črevo smo pridobili v Šolski klavnici in razsekovalnici, Oddelek za zootehnologijo, Biotehniška fakulteta ob rutinskem klanju in raztelešanju kuncev. S sterilnim priborom (skalpel, škarje) smo odvzeli koščke kunčje sluznice in kunčjega fecesa ter jih v sterilnih mikrocentrifugirkah zamrznili (-20 °C). Vzorce kunčje sluznice smo shranili tudi v fiksativu formalinu, kjer smo vzorcem v mikrocentrifugirkah dodali 500 µl formalina (Preglednica 2) in jih shranili v temo na sobni temperaturi.

Vzorci sluznice debelega črevesa in črevesna vsebina pacientov so bili odvzeti v UKC med rednimi kolonoskopskimi pregledi pacientov s sumom na kolorektalni rak oziroma med rednimi postoperativnimi pregledi pacientov. S kolonoskopom je operator s kleščami odvzel približno 30 mg težak in 10 mm² velik košček tumorsko spremenjene črevesne sluznice. Večje tumorske spremembe, ki so jih odvzeli z elektroresekcijo, smo kasneje v laboratoriju aseptično razdelili na približno 30 mg težke dele. Med preiskavo je operator približno 10 cm od tumorsko spremenjene črevesne sluznice odvzel tudi po tri vzorce nespremenjene črevesne sluznice na medsebojni razdalji 5 cm, ki so bili približno 15 mg težki in 6 mm² veliki. Poleg tega je bil pri nekaterih preiskovanih bolnikih iz žepov debelega črevesa odvzet tudi vzorec vsebine debelega črevesa. Vzorci sluznice in vsebine debelega črevesa so bili takoj po odvzemu shranjeni v 50 µl sterilnega pufra TE v predpripravljenih sterilnih mikrocentrifugirkah z navojem ter zamrznjeni (-20 °C).

3.2.3 Priprava bakterijske kulture *F. nucleatum*

Bakterijski sev *F. nucleatum* smo gojili anaerobno v PYG tekočem gojišču. Kulturo smo anaerobno nacepili v t.i Hungatove epruvete s 7,5 ml tekočega gojišča ob vpihavanju N₂. Zaprte epruvete smo inkubirali 24 ur pri 37 °C.

Med inkubacijo smo s spektrofotometrom vsako uro izmerili optično gostoto kulture *F. nucleatum* pri valovni dolžini 654 nm. Za umerjanje spektrofotometra smo uporabili sterilno gojišče PYG. Iz rezultatov meritev smo izrisali rastno krivuljo in iz nje ugotovili časovno obdobje v katerem je kultura *F. nucleatum* v eksponentni fazì rasti.

Število bakterijskih celic zraslih v čisti kulturi smo ugotavljali neposredno, s štetjem celic pod mikroskopom, na števni komori z globino 0,02 mm (Improved Neubauer). Pred štetjem smo namnoženo čisto kulturo bakterij centrifugirali (10 min, 3000 × g), odstranili gojišče in celice oprali v sterilni fiziološki raztopini ter ponovno centrifugirali (10 min, 3000 × g). Nato smo celice resuspendirali v 2 ml fiziološke raztopine. Odvzeli smo 1 ml suspenzije in jo 10 × redčili v fiziološki raztopini. 10 ml raztopine smo alikvotirali v 10 sterilnih mikrocentrifugirk po 1 ml. Iz treh mikrocentrifugirk smo odvzeli po 100 µl suspenzije in vsako posebej redčili v 100 µl oziroma 200 µl fiziološke raztopine. Tako redčene suspenzije celic smo nanesli na števno komoro. Celice smo štelci pod mikroskopom pri 400 × povečavi. Pri tem smo prešteli število celic v petih kvadratih in izračunali povprečno število celic v kvadratu. Glede na dimenzijske komore smo izračunali volumen suspenzije v enem kvadratu (0,2 × 0,2 × 0,02 mm³) in upoštevajoč redčitve izračunali število celic/ml po enačbi:

$$\text{število } \frac{\text{celic}}{\text{ml}} = \frac{\text{povprečno št. celic v enem kvadratu}}{\text{volumen kvadrata}} \times \text{faktor redčitve} \quad \dots(1)$$

Polovico mikrocentrifugirk s preštetimi bakterijami bakterij smo zamrznili pri -20 °C, drugi polovici mikrocentrifugirk smo dodali formalin in jih shranili v temi na sobni temperaturi.

3.2.4 Osamitev skupne mikrobne DNK iz vzorcev

Iz vzorcev, ki smo jih pripravili, kot je opisano v zgornjih točkah, smo osamili mikrobno DNA. Pri tem smo uporabili postopek, ki je vključeval fizikalno ali kemijsko razbijanje celic in kemijsko čiščenje. Vzorcem s kunčjo sluznico smo dodali 600 µl pufra TE. Vzorce fecesa smo pred razbijanjem celic sprali v 1ml pufra TE in centrifugirali (5 min, 7000 × g), odstranili supernatant in resuspendirali pelete v 600 µl pufra TE. Pri enakih pogojih smo centrifugirali tudi v FR shranjene bakterije *F. nucleatum*, odstranili supernatant in prav tako resuspendirali bakterijski pelet v 600 µl pufra TE.

Nato smo mikrobne celice v vzorcih razbili z uporabo fizikalnih sil in to bodisi z ultrazvočnim razbijanjem bodisi s stresanjem v krogličnem stresalniku. Z ultrazvočnim razbijalcem smo celice razbili v treh ciklih s po 30 sekundnim delovanjem in 15 sekundnim premorom pri amplitudi 10. Med delovanjem ultrazvočnega razbijalca so bili vzorci ves čas hlajeni z ledom. Mikrobne celice smo fizikalno razbijali tudi s stresanjem v krogličnem stresalu, pri čemer smo vzorce zmešali z 0,25 g cirkonijevih kroglic velikosti 0,1 mm in 0,25 g cirkonijevih kroglic velikosti 0,5 mm, (BioSpec, ZDA). Vzorce s kroglicami smo stresali pri 30 Hz v treh ciklih s po 30 sekundnim delovanjem in 1,5 minutnim hlajenjem na ledu. Na kemijski način smo celice razbili s 3 µl proteinaze K s koncentracijo (18,5 mg/ml) in 30 µl 10 % SDS, ki smo ju dodali vzorcem. Nato smo vzorce inkubirali v termobloku (1 h, 65 °C).

Obdelane vzorce smo centrifugirali (8 min, 12000 × g), prenesli supernatant v sterilne mikrocentrifugirke, dodali 100 µl 5 M NaCl in dobro premešali. Nato smo dodali še 80 µl CTAB/NaCl, ki smo ga predhodno segreli na 65 °C, vse skupaj dobro premešali ter inkubirali v termobloku (10 min, 65 °C). Vzorcem smo dodali enak volumen kloroform, premešali, centrifugirali (10 min, 12000 × g) in prenesli vodno fazo v novo sterilno mikrocentrifugirko. Nato smo ponovili ekstrakcijo, najprej z dodatkom mešanice fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1, pH 8), nato pa ponovno s kloroformom. DNA smo oborili z dodatkom 60 vol. % izopropanola in centrifugirali (5 min, 14000 × g). Odstranili smo supernatant in pelet sprali s 500 µl 70 % etanola, zopet centrifugirali pri istih pogojih ter odstranili ves etanol. Mikrocentrifugirke smo odprli ter osušili ob gorilniku. Izolirano DNA smo raztopili v 50 µl pufra TE. Poleg opisanih metod smo skupno mikrobno DNA iz vzorcev kunčje sluznice osamili s tremi komercialnimi kompleti: (i) SmartHelix™ DNAid, (ii) ExtractMaster™ Fecal DNA Extraction Kit in (iii) QIAamp DNA Stool Mini Kit. Osamitev mikrobne DNA smo izvedli po navodilih proizvajalcev.

Pri osamitvi skupne mikrobne DNA iz vzorcev kunčje sluznice in vzorcev čiste kulture bakterij *F. nucleatum*, ki so bili shranjeni v formalinu, smo vzorce najprej centrifugirali

(10 min, $10000 \times g$) in previdno s pipeto odstranili formalin. Nato smo sluznico 2 × sprali v 1 ml pufra TE in ponovno centrifugirali (10 min, $10000 \times g$). Spranim koščkom smo dodali 500 μl ekstrakcijskega pufra in 41,2 μl proteinaze K ter vzorce inkubirali (12 h, 50 °C) (Rodriguez in sod., 2002). Nadalje je osamitev potekala na enak način kot pri vzorcih zamrznjene sluznice.

Na podlagi zgoraj opisane metode za osamitev mikrobne DNK iz kunčjih vzorcev, smo za vzorce človeške sluznice in črevesne vsebine uporabili protokol, v katerem smo mikrobne celice fizikalno razbili z ultrazvočnim razbijanjem po programu 3 × 30 s delovanja $\times 15$ s premora in amplitudo 6. Naprej smo vzorce obdelali kot je opisano. Protokol se je razlikoval le v tem, da smo vzorce imeli ves čas na ledu in da smo vsa centrifugiranja izvedli v hlajeni centrifugi pri 4 °C.

S spektrofotometrom smo preverili čistost in količino osamljene DNK.

3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost osamitve bakterijske DNK in nastanek specifičnih pomnožkov pri PCR smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. Za ugotavljanje uspešnosti osamitve bakterijske DNK smo pripravljali 0,8 % agarozni gel, medtem ko smo za preverjanje nastanka specifičnih pomnožkov pri PCR pripravljali 1 % agarozni gel. Pri tem smo agarozo raztopili v $0,5 \times$ TBE pufru v mikrovalovni pečici. Vzorce smo pred nanašanjem na gel primerno redčili in jim dodali pufer za nanašanje vzorcev. Za oceno velikosti DNK smo uporabljali velikostni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti (5-10 V/cm) v $0,5 \times$ TBE pufru. Gele smo po končani elektroforezi inkubirali 20 minut v raztopini etidijevega bromida koncentracije 1 $\mu g/ml$ in nato spirali 30 minut v destilirani vodi. Gele smo dokumentirali s sistemom Gel Doc 1000 in programom Molecular analyst 1.5.

3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo

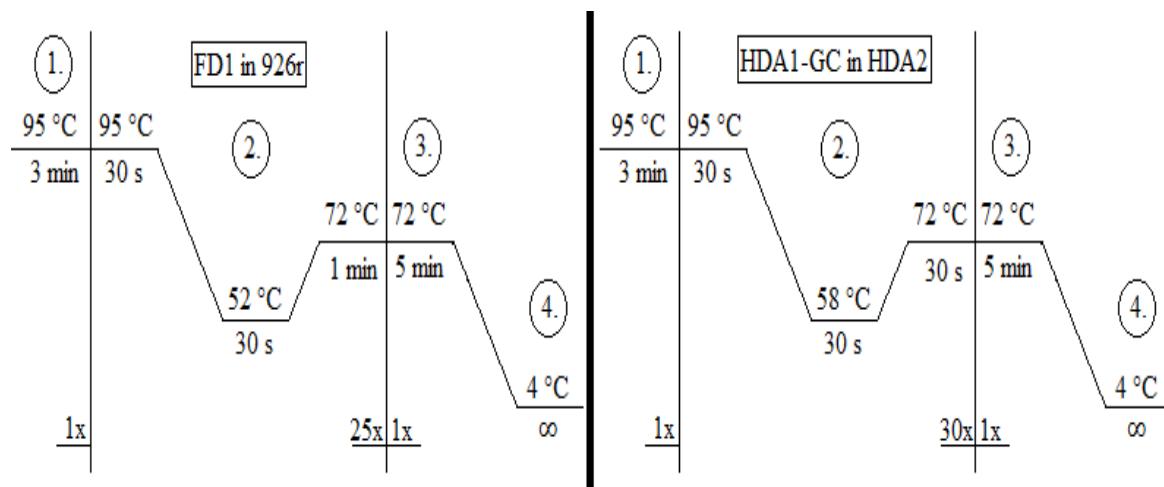
Pri verižni reakciji s polimerazo (PCR) smo uporabljali začetne oligonukleotide, ki naregajo na različne regije genov za 16S rRNA (Preglednica 3).

Za preverjanje uspešnosti izolacije mikrobne DNK iz vzorcev črevesne sluznice in črevesne vsebine smo izvedli PCR z uporabo bakterijskih univerzalnih začetnih oligonukleotidov FD1 in 926r. Za vsak vzorec smo v zato namenjeni komori pripravili 20 μl reakcijske mešanice s končnimi koncentracijami: 0,5 μM začetnih oligonukleotidov; 2,5 mM MgCl₂; 1 × *Taq* pufer +KCl -MgCl₂; 0,1 mM vsakega dNTP; 0,025 U/ μl Fermentas *Taq* polimeraze. Mešanici smo dodali H₂O (Sigma) do volumena 24 μl in na delovnem pultu še 1 μl DNK matrice.

Verižno reakcijo s polimerazo smo izvedli z uporabo cikličnega termostata MyCycler po programu:

- 1. korak začetna denaturacija bakterijske 16S rDNK (3 min, 95 °C)
- 2. korak (25×):
 - (i) denaturacija (30 s, 95 °C)
 - (ii) naleganje začetnih oligonukleotidov (30 s, 52 °C)
 - (iii) polimerizacija (1 min, 72 °C)
- 3. korak: končna polimerizacija (5 min, 72 °C)
- 4. korak: hlajenje vzorcev (4 °C).

Pri izvedbi PCR za analizo DGGE smo uporabili začetne oligonukleotide HDA1-GC in HDA2 (Preglednica 3). Program je obsegal 30 ciklov in temperatura naleganja začetnih oligonukleotidov je bila 58 °C. Zaradi krajsrega PCR pomnožka (200 bp), smo skrajšali čas polimerizacije na 30 sekund (Slika 6).



Slika 6: PCR program za začetne oligonukleotide FD1 in 926r ter HDA1-GC in HDA2.

3.2.7 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta

Analizo DGGE smo izvedli s sistemom D GENE™ Denaturing Gel Electrophoresis System. Gel za DGGE smo pripravili kot 8 % poliakrilamidni gel z 30-60 % gradientom iz 7 mol/l uree in 40 % formamida, katerih koncentraciji sta naraščali vzdolž elektroforeze. Razmerje dodanega akrilamid/bisakrilamida v gelih je bilo 37:1. Pred vlivanjem gelov smo v pripravljeni mešanici dodali amonijev persulfat (APS), ki je predstavljal vir prostih radikalov, v prisotnosti katerih je prišlo do polimerizacije akrilamida. Dodali smo še katalizator TEMED, ki je zagotovil počasno sproščanje radikalov iz APS-a in s tem enakomerno zamreženje gela. Gel smo vlinili v prostor med 16 × 16 cm velikima steklenima ploščama z 1 mm debelim vmesnim distančnikom, ki smo ju vpeli v plastične primeže. Polimerizacija gela je potekala 3 ure. Nato smo na gel nanesli po 25 µl posameznega vzorca

in 25 µl nalagalnega pufra. Pri tem smo uporabili 2 × nanašalni pufer z glicerolom. Elektroforeza je potekala v 1 × TAE pufru pri 65 °C, 75 V, 70 mA ter 5 W in sicer 16,5 ur. Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 minut v 1 × raztopini barvila SYBR® Safe DNA Gel Stain. Sledilo je slikanje gela z UV transiluminatorjem in programom GeneSnap. Nadalje smo s programom BioNumerics pridobljene molekularne profile pri različnih gelih z normalizacijo na osnovi v laboratoriju pripravljene standardne lestvice primerjali med seboj. Pri primerjavi molekularnih profilov smo uporabili Pearson-ov koeficient korelacije. Odstotke podobnosti med primerjanimi vzorci smo statistično ovrednotili z Mann-Whitney testom, ki smo ga izvedli s programom SPSS®Statistic v. 20.

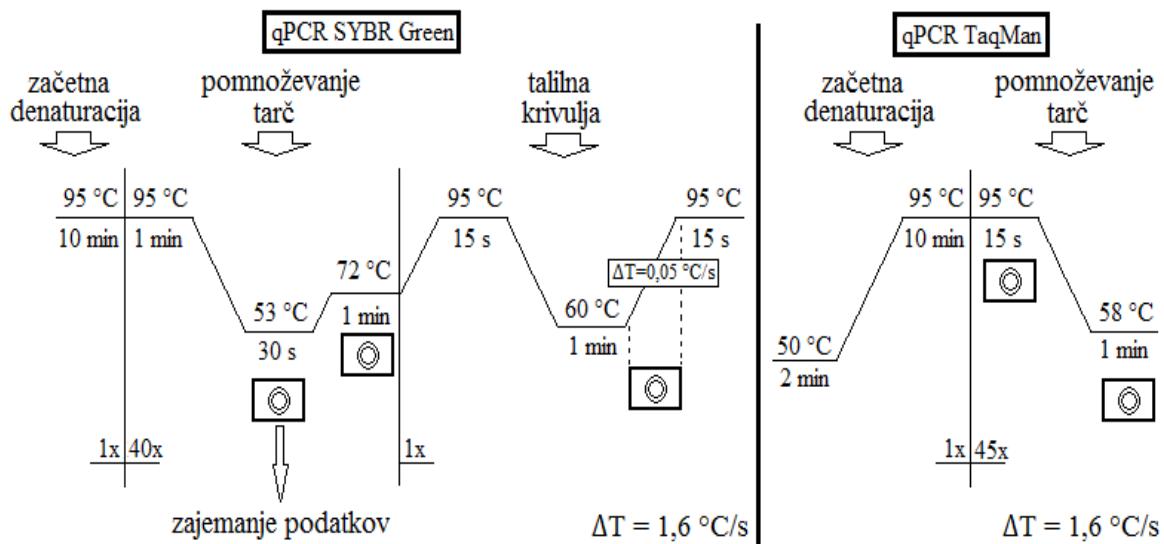
3.2.8 PCR v realnem času

Količino fuzobakterij v vzorcih smo določali relativno na celotno število vseh bakterij v vzorcih. Pri tem smo uporabili PCR metodo v realnem času (qPCR). Pri delu smo uporabili dva tipa qPCR.

Za ugotavljanje celotnega števila vseh bakterijskih tarč v vzorcih človeške sluznice, črevesne vsebine in čistih bakterijskih kultur smo uporabili metodo qPCR s fluorescenčnim barvilkom SYBR Green I in začetne oligonukleotide Eub 338f in Eub 518r (Preglednica 3). Za reakcijsko mešanico smo uporabili osnovno raztopino KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit, kateri smo dodali 100 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov in H₂O do 15 µl. Nato smo pripravljeno reakcijsko mešanico alikvotirali po 15 µl na optično ploščo MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystem). Na delovnem pultu smo pripravili po 5 µl ustreznih redčitev standarda in vzorcev ter jih v tripletih dodali reakcijski mešanici na optični plošči. Za standard smo uporabili redčitve osamljene DNK čiste kulture *F. nucleatum*, ki smo jo pripravili kot je opisano v prejšnjih točkah. Vzorce smo redčili 125 ×. Na optično ploščo smo dodali tudi negativne kontrole (NTC; *angl.* no template control), ki so namesto tarčne DNK vsebovale po 5 µl H₂O.

Za ugotavljanje števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* smo uporabili TaqMan sondno Boutaga TM, z reporterjem FAM (*angl.* 6-carboxyfluorescein) in dušilcem TAMRA (*angl.* tetramethylrhodamine) ter začetne oligonukleotide Boutaga F in Boutaga R (Preglednica 3). Osnovni raztopini TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG, smo dodali 300 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov in 300 µM sonde ter dopolnili s H₂O do 15 µl. Nadalje smo uporabili iste redčitve standarda kot pri SYBR Green metodi, vzorce pa smo redčili 25 ×. Tako standard, kot tudi vzorce smo v tripletih dodali reakcijski mešanici na optični plošči. Kot pri SYBR Green metodi, smo na ploščo nanesli tudi negativne kontrole. Pri obeh metodah qPCR je bilo v reakcijski mešanici prisotno še barvilo ROX, ki je omogočalo normalizacijo rezultatov med različnimi vzorci.

Obe qPCR reakciji smo izvedli v napravi ViiA 7.0. Programa pomnoževanja sta se pri obeh metodah razlikovala in sta prikazana v nadaljevanju (Slika 7).



Slika 7: PCR program za qPCR SYBR Green in qPCR TaqMan.

Rezultate qPCR sistemov smo ovrednotili s priloženim programom ViiA 7.0 in jih izvozili v obliki tabele.

3.2.9 Obdelava podatkov qPCR

Podatke, ki smo jih dobili pri obeh tipih qPCR, smo v obliki tabele vnesli v program Excel. Glede na standardno krivuljo je program ViiA 7.0 podal povprečno število bakterijskih tarč v luknjicah na optični plošči, ki so vsebovale trojne ponovitve istega vzorca. Nato smo na podlagi redčitve posameznega vzorca, količine uporabljene DNK matrice v reakcijski mešanici qPCR in volumena pufra TE, v katerem smo raztopili osamljeno bakterijsko DNK, izračunali število bakterijskih tarč v prvotnem vzorcu sluznice ozziroma črevesne vsebine. Izračun je prikazan v enačbi:

$$\text{št. tarč v vzorcu} = \text{št. tarč v matrici qPCR} \times \text{redčitev} \times \text{volumen TE} \quad \dots(2)$$

Skupno število vseh bakterijskih tarč predstavlja mero s katero smo izničili vpliv različne učinkovitosti osamitve bakterijske DNK iz posameznega vzorca. Relativno na to število smo namreč preračunali število fuzobakterijskih tarč v posameznem vzorcu. Pri tem smo uporabili enačbo:

$$\text{rel. št. fuzob. tarč v vzorcu} = \frac{\text{št.fuzob.tarč v vzorcu}}{\text{celokupno št.bakt.tarč v vzorcu}} \times 100 \quad \dots(3)$$

V primeru, da smo pri pacientu analizirali več vzorcev nespremenjene sluznice (Bp) ali rakavo spremenjene sluznice, smo ugotovljena števila fuzobakterijskih tarč povprečili.

Nadalje smo primerjali ugotovljena števila fuzobakterijskih tarč v vzorcu nespremenjene sluznice in rakavo spremenjene sluznice (tumor). Zaradi boljše preglednosti smo podatke normalizirali. Tako smo številu fuzobakterijskih tarč v Bp vzorcih pripisali vrednost 1, medtem ko smo količine fuzobakterijskih tarč v tumorsko spremenjeni sluznici in fecesu normalizirali po enačbi:

$$\text{normal. št. fuzob. tarč tumorja} = \frac{\text{rel.št.fuzob.tarč tumorja}}{\text{rel.št.fuzob.tarč Bp vzorca}} \quad \dots(4)$$

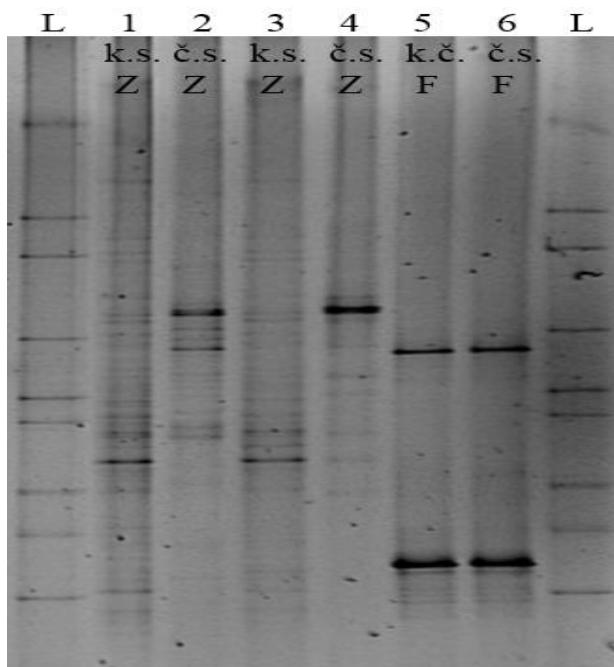
Standardne odklone (SD) smo izračunali kot je opisal Hogan (2006). Stopnje spremembe v številu fuzobakterij v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice smo statistično ovrednotili z Wilcoxon testom, ki smo ga izvedli s programom SPSS®Statistic v. 20. Wilcoxon test je neparametričen test, ki ga uporabimo takrat, ko populacije niso nujno normalno porazdeljene (Žibret, 2012).

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA METOD

4.1.1 Osamitev DNK iz zamrznjenih in v formalinu fiksiranih vzorcev

Kot je opisano v materialih in metodah (3.2.4), smo osamili skupno mikrobno DNA iz zamrznjenih in iz v formalinu fiksiranih vzorcev sluznice kunčjega ter človeškega debelega črevesa. Ko smo obdelovali v formalinu fiksirane vzorce smo le-te dodatno spirali s TE pufom, dodali ekstrakcijski pufer ter opravili kemijsko lizo s proteinazo K. Nadalje smo pomnožili mikrobno 16S rRNK v PCR reakciji in pri tem uporabili začetne oligonukleotide HDA. Na agaroznem gelu smo po elektroforetski ločitvi opazili okrog 200 bp dolge pomnožke (ni prikazano). Nato smo pomnožke analizirali z DGGE elektroforezo, kot je opisano v poglavju materiali in metode (3.2.7). Rezultati so prikazani spodaj (Slika 8).

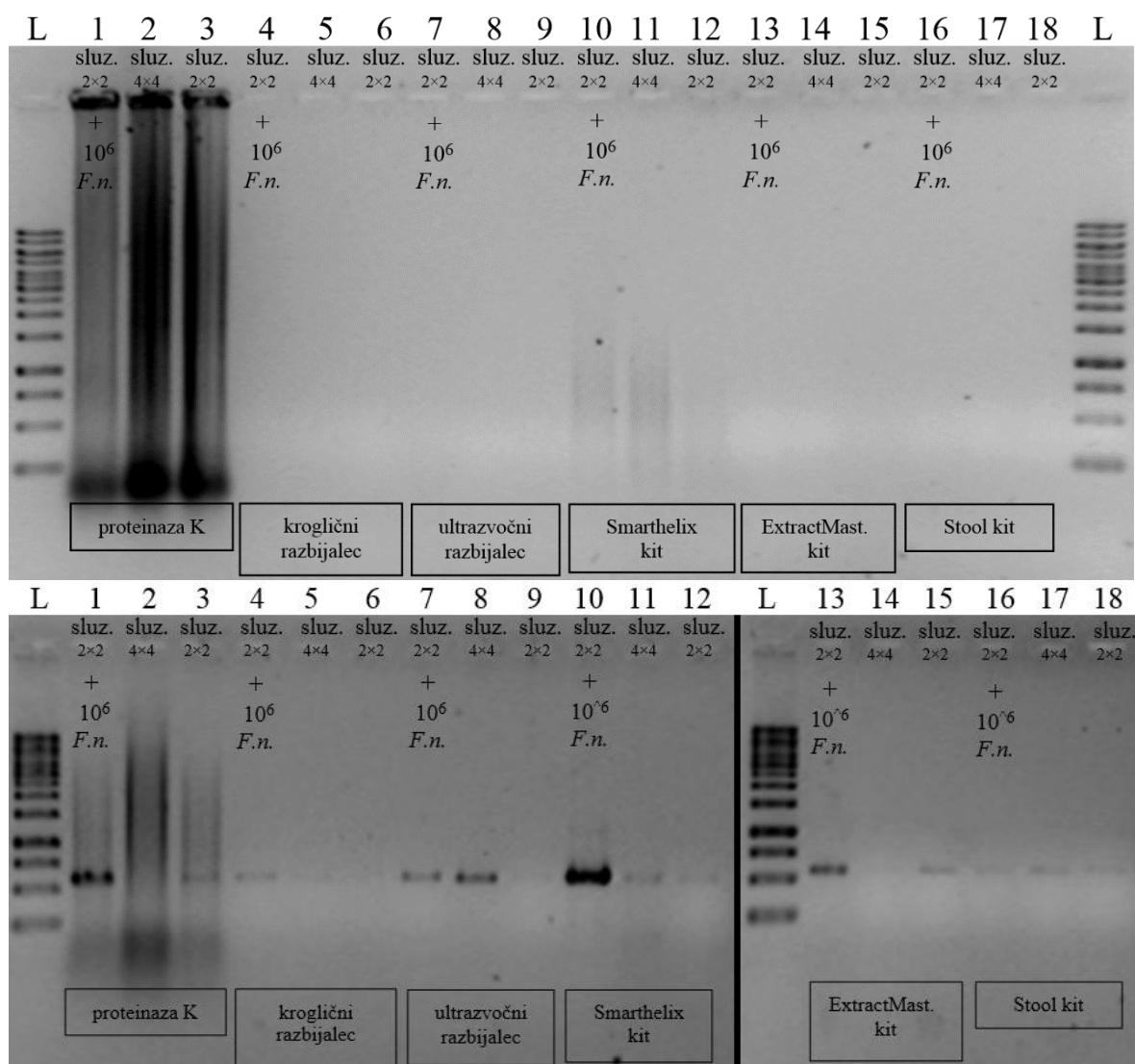


Slika 8: DGGE gelska elektroforeza pomnožkov genov za mikrobno 16S rRNK iz zamrznjenih in v formalinu fiksiranih vzorcev sluznice kunčjega ter človeškega debelega črevesa. Stolpec »L« je lestvica, »k.s.« sluznica kunčjega debelega črevesa, »č.s.« sluznica človeškega debelega črevesa, »Z« zamrzovanje vzorcev in »F« fiksacija vzorcev v formalinu.

Analiza DGGE je pokazala, da smo iz zamrznjenih vzorcev kunče sluznice pomnožili primerljive profile črevesne mikrobiote. Podobno se je pokazalo tudi pri zamrznjenih vzorcih človeške sluznice, medtem ko se profili iz vzorcev kunče in človeške sluznice jasno razlikovali. V primeru vzorcev, ki so bili fiksirani v formalinu, se profila iz kunče in človeške sluznice med sabo nista razlikovala, sta se pa razlikovala od profilov mikrobiote zamrznjenih vzorcev. Iz v formalinu fiksiranih vzorcev smo pomnožili tudi manj kompleksne profile DGGE kot iz zamrznjenih vzorcev.

4.1.2 Uporaba različnih metod osamitve skupne mikrobne DNK in izbor najprimernejše metode

Kot je opisano v materialih in metodah (3.2.4), smo z vključevanjem proteinaze K, krogličnega razbijalca ali ultrazvočnega razbijalca ter s komercialno dostopnimi kompleti poskušali iz vzorcev sluznice kunčjega debelega črevesa osamiti skupno mikrobno DNA. Pri tem smo uporabili (i) koščke kunčje črevesne sluznice velikosti 4 mm^2 , (ii) koščke kunčje črevesne sluznice velikosti 16 mm^2 in (iii) koščke kunčje črevesne sluznice velikosti 4 mm^2 , ki smo jim kot pozitivno kontrolo dodali 10^6 bakterij *F. nucleatum*. Nadalje smo pomnožili gene za mikrobno 16S rRNA v PCR reakciji z začetnimi oligonukleotidi Eub 338f in 926r. Rezultati so prikazani spodaj (Slika 9).



Slika 9: Gelska elektroforeza skupne mikrobne DNK (zgoraj) in PCR pomnožkov iz skupne mikrobne DNK (spodaj). Števila od 1 do 18 predstavljajo vzorce, stolpec »L« je velikostna lestvica, oznaka »F.n.« je čista kultura bakterije *F. nucleatum* in »sluz.« je kunčja sluznica.

Po končani kemički lizi pri metodi osamitve s proteinazo K v mikrocentrifugirki nismo več opazili tkiva kunče sluznice, medtem ko je pri metodah s krogličnim in ultrazvočnim razbijalcem, kot tudi pri uporabljenih kitih za osamitev DNK, po razbijanju tkivo ostalo opazno. Po gelski elektroforezi pridobljene DNK smo le-to opazili le pri metodi z uporabljeno proteinazo K in pri kompletu Smartherlix. Po izvedbi PCR metode pa smo po gelski elektroforezi odkrili različne količine ustrezno velikih pomnožkov pri vzorcih kunče sluznice z dodanimi bakterijami pri vseh uporabljenih metodah. V vzorcih brez dodane kulture bakterij *F. nucleatum* smo mikrobno DNK uspešno osamili z uporabo ultrazvočnega razbijalca in s kompletom Smartherlix pri sluznici velikosti 16 mm^2 . PCR pomnožke iz skupne mikrobne DNK smo opazili tudi pri vzorcih kunče sluznice velikosti 4 mm^2 pri osamitvi s proteinazo K, pri osamitvi z ultrazvočnim razbijalcem ter pri osamitvah s komercialnimi kiti.

4.2 ANALIZA VZORCEV PACIENTOV

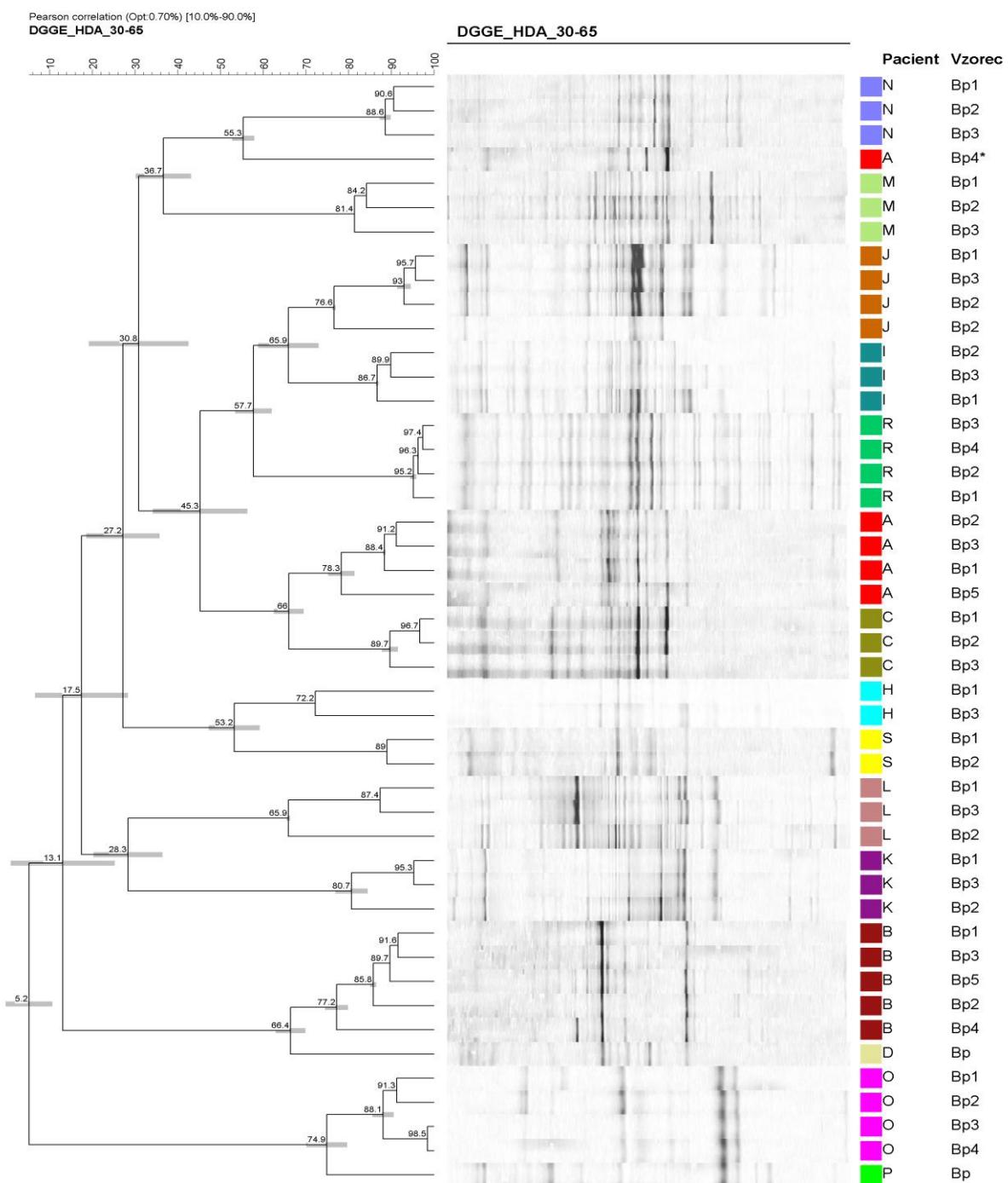
Z uporabo ultrazvočnega razbijalca smo osamili skupno mikrobno DNK iz zamrznjenih vzorcev črevesne vsebine ter nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice preiskovanih pacientov. Uspešnost osamitve smo preverili z reakcijo PCR z začetnima oligonukleotidoma Eub 338f in 926r ter agarozno gelsko elektroforezo (ni prikazano). Skupno mikrobno DNK smo uspešno osamili iz vzorcev 16 pacientov, ki smo jih označili zaporedno po abecedi od A do S (brez šumnikov). Iz vzorcev pacientov E in F mikrobne DNK nismo uspeli osamiti.

4.2.1 Sestava mikrobiote

Pri vzorcih iz katerih smo uspešno osamili mikrobno DNK, smo s PCR metodo z začetnimi oligonukleotidi HDA pomnožili gene za mikrobno 16S rRNK. Pomnožke smo ločili z DGGE elektroforezo in rezultate analizirali s programom BioNumerics. Analizo smo uspešno izvedli na vzorcih 15 pacientov, ne pa na vzorcih pacienta G, pri katerih nismo uspeli pripraviti zadostne količine ustreznega PCR pomnožka za nadaljnjo DGGE analizo. Slike DGGE gelov so v prilogah (Priloga A-R).

4.2.1.1 Primerjava sestave črevesne mikrobiote v vzorcih nespremenjene črevesne sluznice
 Najprej smo primerjali razlike v sestavi mikrobiote v vzorcih nespremenjene (»zdrave«) črevesne sluznice pacientov. Rezultati so prikazani v obliki dendrograma spodaj (Slika 10). DGGE profili mikrobiote iz vzorcev nespremenjene črevesne sluznice istega pacienta se po podobnosti v dendrogramu uvrstijo skupaj. Do tega pride tako pri 10 pacientih pri katerih so bili vzorci odvzeti iz istega predela debelega črevesa ali danke (H - O, R in S), kot tudi pri treh pacientih, kjer so bili vzorci nespremenjene črevesne sluznice odvzeti iz različnih predelov vzdolž debelega črevesa in danke (A, B in C). Ločeno od ostalih vzorcev istega pacienta se je uvrstil le vzorec divertiklov z oznako Bp4 pri pacientu A. Pri pacientih D in P je v dendrogramu prisoten le po en vzorec nespremenjene črevesne sluznice. Pri pacientu D je vzrok v tem, da je bil med kolonoskopijo odvzet le en takšen vzorec, medtem ko pri pacientu P uspešno osamili in pomnožili mikrobno DNK le iz enega od dveh vzorcev

nespremenjene črevesne sluznice. Zaradi šibkega signala in posledično neinformativnega DGGE profila smo iz analize izključili vzorec Bp2 pacienta H.

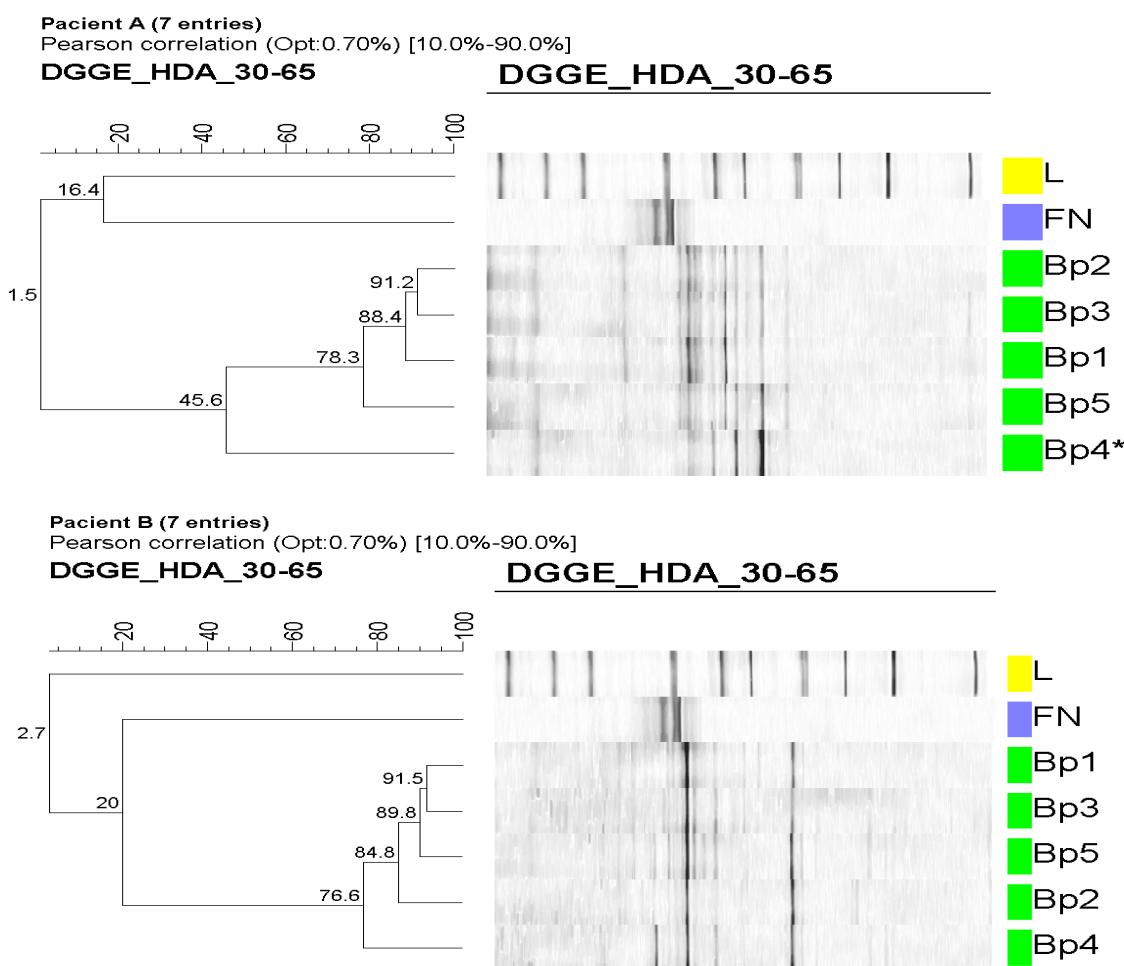


Slika 10: Dendrogram DGGE profilov iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij iz vzorcev nespremenjene sluznice debelega črevesa različnih pacientov. Črka označuje posameznega pacienta, oznaka »Bp« pomeni vzorec brez spremembe. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti. Bp4* - divertikli: sindrom razdražljivega črevesa z obstipacijo

4.2.1.2 Primerjava sestave črevesne mikrobiote v vzorcih nespremenjene (»zdrave«) in tumorsko spremenjene črevesne sluznice

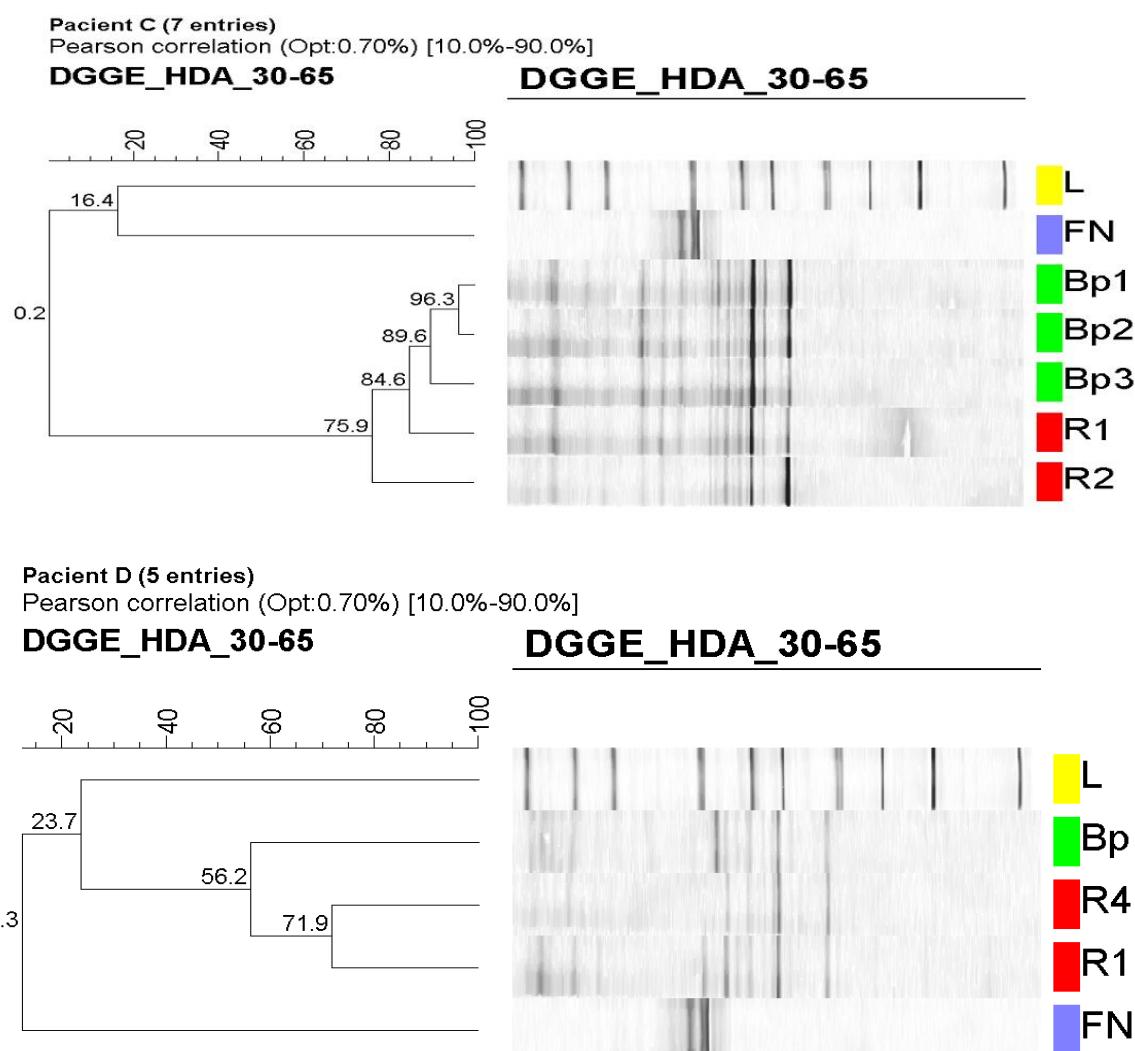
Rezultati primerjave sestave črevesne mikrobiote v vzorcih posameznega pacienta so prikazani z dendrogrammi, ki smo jih izrisali za vsakega pacienta posebej in so predstavljeni v nadaljevanju.

Pri pacientih A, B in C so profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice (Bp), ki so bili odvzeti v različnih predelih vzdolž distalnega prebavnega trakta, zelo podobni ($85 \pm 8\%$) (Slika 11 in 12). Izjema je vzorec z oznako Bp4 pri pacientu A, katerega DGGE profil pomnožkov genov za 16S rRNK je drugim podoben le 46 %.



Slika 11: Profili DGGE pomnožkov genov za mikrobro 16S rRNK (desno) in dendrograme podobnosti med profili (levo) pri pacientu A in pacientu B. Vzorci nespremenjene črevesne sluznice so bili odvzeti iz različnih delov prebavnega trakta. Mesta odvzema vzorcev pri pacientu A so bila: Bp1 – slepo črevo, Bp2 – desni zavoj debelega črevesa, Bp3 – prečni kolon, Bp4* – esasto črevo (divertikli: sindrom razdražljivega črevesa z obstopicijo), Bp5 – danka. Mesta odvzema vzorcev pri pacientu B so bila: Bp1 – slepo črevo, Bp2 - desni zavoj debelega črevesa, Bp3 – prečni kolon, Bp4 - esasto črevo, Bp5 – danka. Oznake pomenijo: »L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Tudi pri pacientu C so profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice med sabo zelo podobni ($93 \pm 5\%$). Vzorec Bp1 je bil odvzet v slepem črevesu, vzorca Bp2 ter Bp3 pa v predelu navzgornjega kolona. Profila tumorsko spremenjene črevesne sluznice iz danke sta si 66 % podobna. Pri pacientu D je profil nespremenjene črevesne sluznice iz slepega črevesa 56 % podoben profiloma tumorsko spremenjene črevesne sluznice, ki sta si med sabo podobna 72 % in sta bila odvzeta iz predela esastega črevesa ter danke (Slika 12).



Slika 12: Profili DGGE pomnožkov genov za mikrobno 16S rRNK (desno) in dendrograma podobnosti med profili (levo) pri pacientu C in pacientu D. Vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice so bili odvzeti iz različnih delov prebavnega trakta. Pri pacientu C so bili vzorci odvzeti: Bp1 – slepo čревo, Bp2 in Bp3 – navzgornji kolon, R1 in R2 – danka (adenom nizke stopnje displazije). Pri pacientu D so bili vzorci odvzeti: Bp – slepo čревo, R1 - esasto čревo (adenom nizke stopnje displazije), R4 – danka (adenom nizke stopnje displazije). Označe pomenijo: »L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez sprememb, »R« tumorsko spremenjen vzorec. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Preglednica 4: Povprečja odstotkov podobnosti med (i) profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice odvzete iz istega predela debelega črevesa, (ii) profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice odvzete iz različnih predelov vzdolž debelega črevesa ter med (iii) profili DGGE iz nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice.

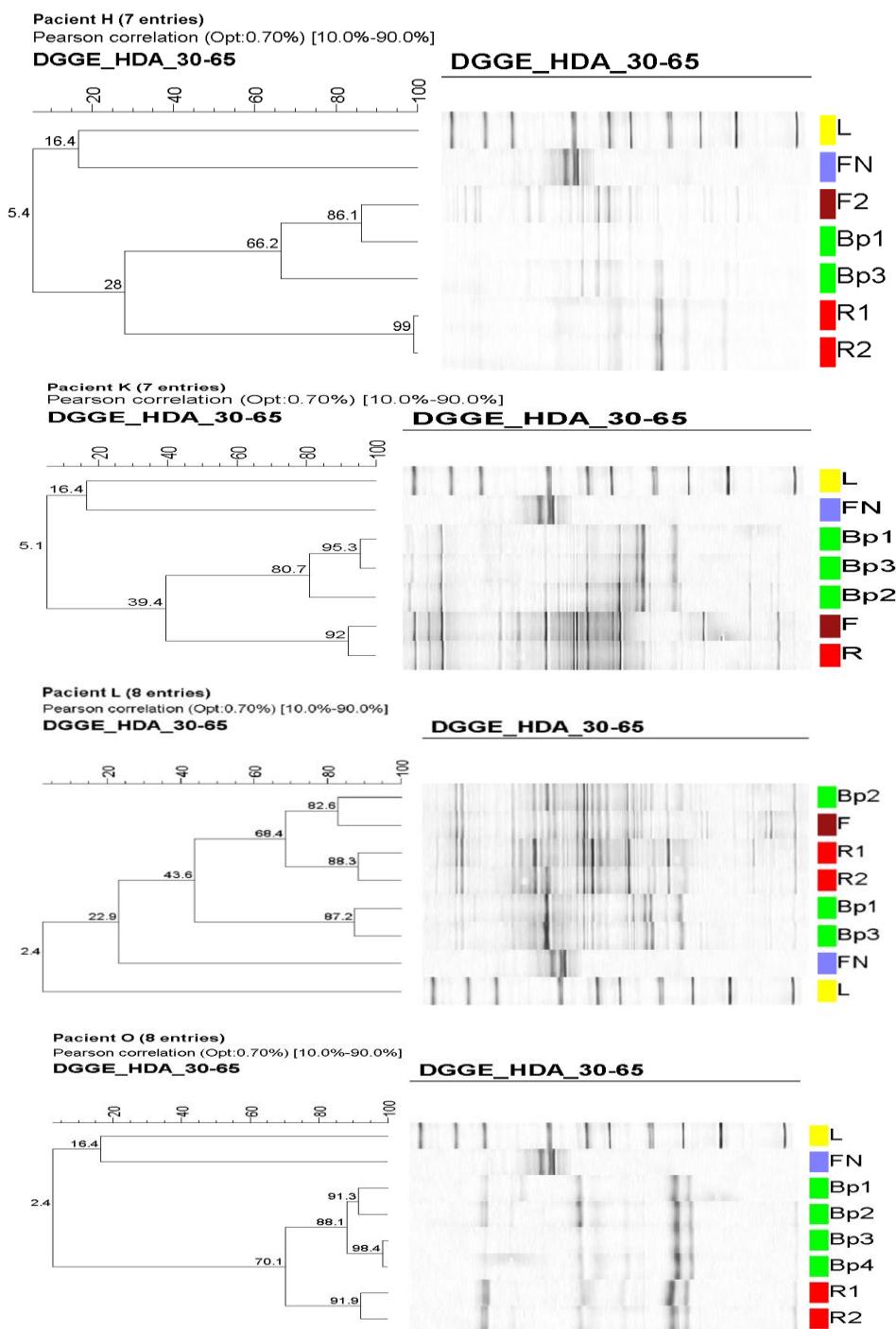
Primerjava	Povprečje podobnosti	Standardni odklon	P-vrednost *
Nespremenjena sluznica (isti predel črevesa)	88 %	9 %	
Nespremenjena sluznica (različni predel črevesa)	85 %	8 %	P = 0,98
Nespremenjena : tumorsko spremenjena sluznica	65 %	20 %	P < 0,01

* primerjava podobnosti z nespremenjeno sluznico (isti predel črevesa), Mann-Whitney test. Izračuni programa SPSS so v prilogah (Priloga W).

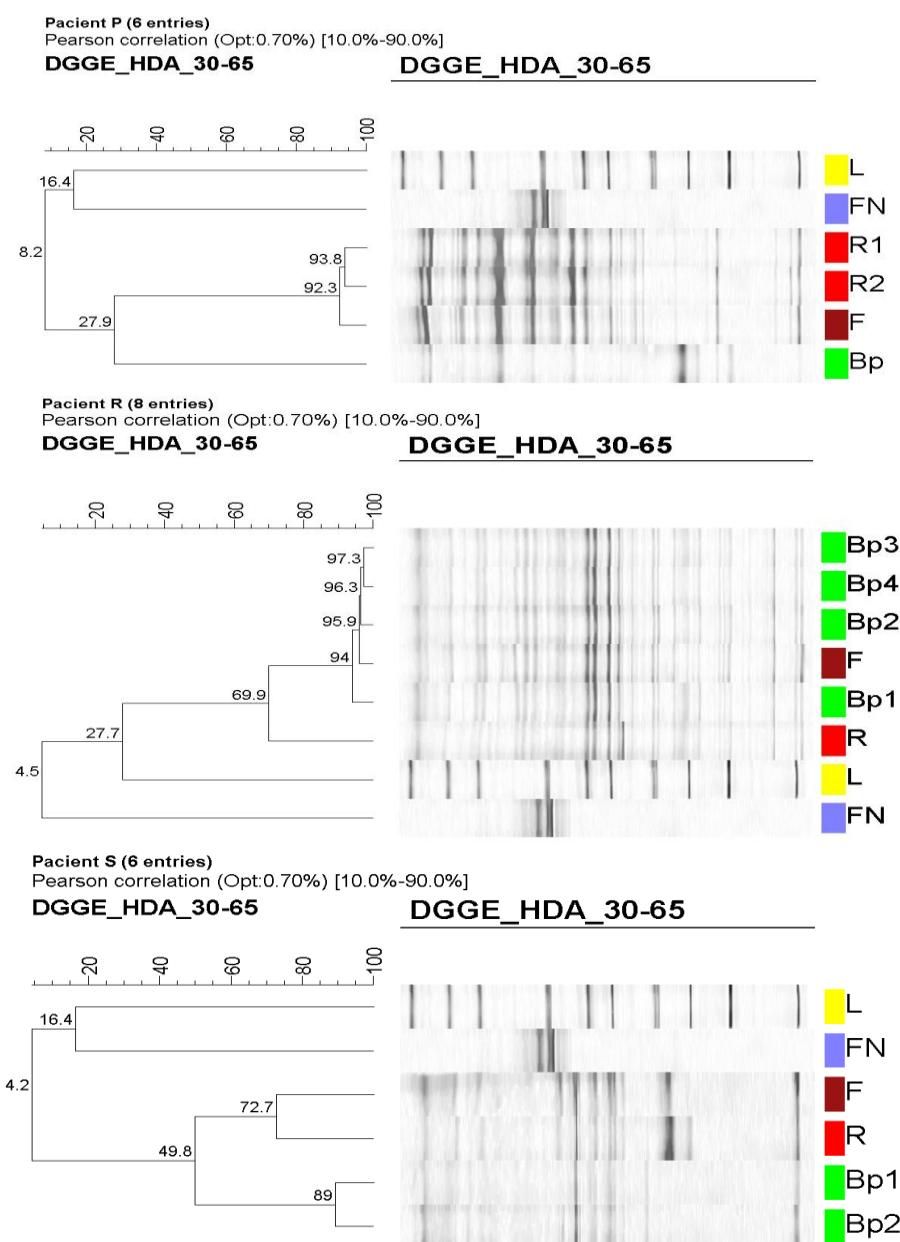
Pri pacientih, kjer so bili vzorci odvzeti iz istega predela debelega črevesa ali danke, so si bili profili DGGE iz nespremenjene črevesne sluznice pri posameznem pacientu med sabo v povprečju bolj podobni ($88 \pm 9\%$), kot so si bili med seboj podobni profili tumorsko spremenjene in nespremenjene črevesne sluznice ($65 \pm 20\%$). Profili DGGE iz tumorsko spremenjene črevesne sluznice so bili manj kot 75 % podobni profilom DGGE iz vzorcev nespremenjene črevesne sluznice pri sedmih pacientih (H, K, L, O, P, R in S) (Slika 13 in 14). Podobnost med obema tipoma vzorcev je bila večja od 75 % pri štirih pacientih (I, J, M in N) (Slika 15). Rezultati so prikazani v preglednici spodaj (Preglednica 5).

Preglednica 5: Odstotki podobnosti med DGGE profili iz nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice pri pacientih, pri katerih so bili vzorci odvzeti iz istega predela debelega črevesa ali danke.

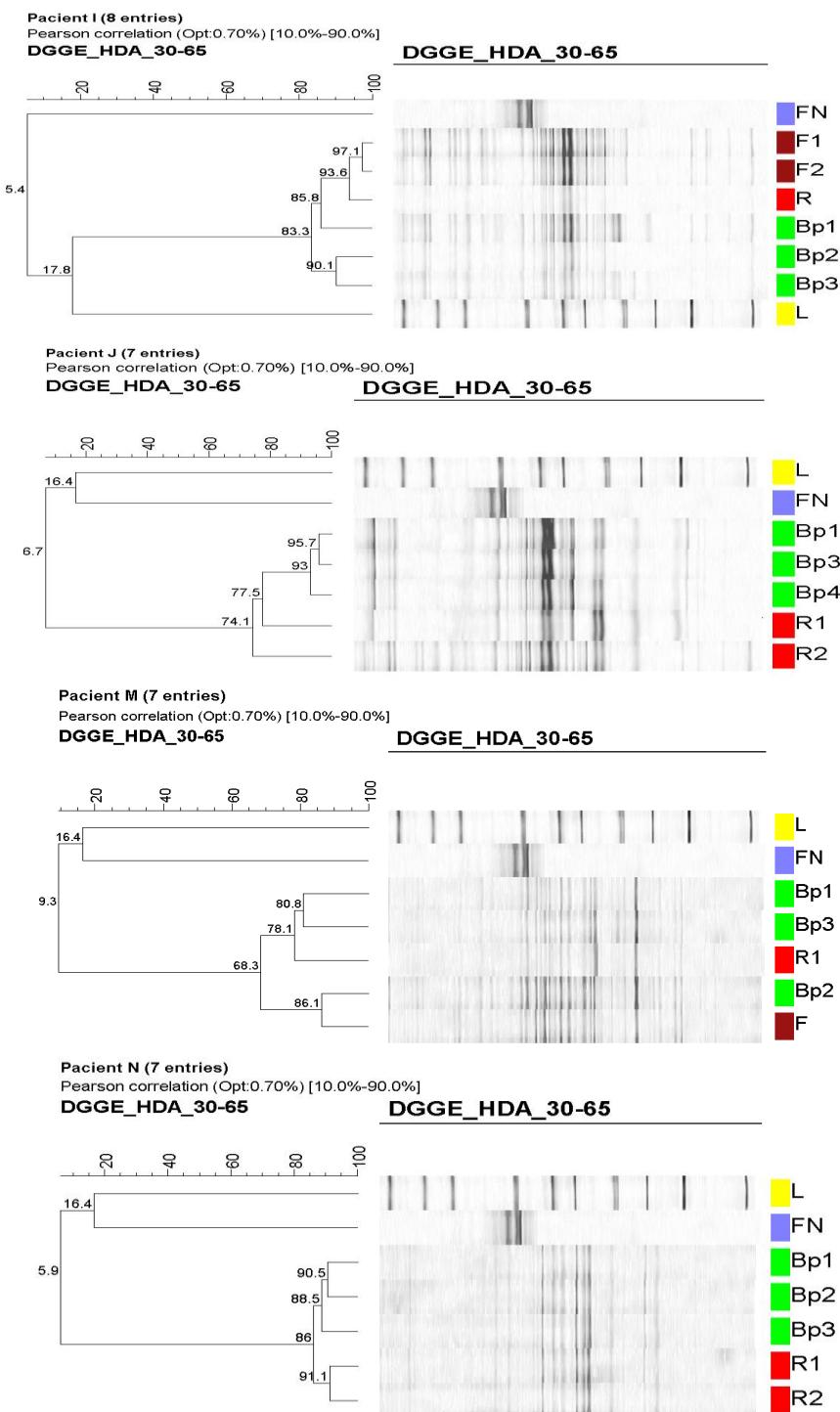
Podobnost			
< 75 %		> 75 %	
Pacient	% podobnosti	Pacient	% podobnosti
H	22	I	85
K	39	J	78
L	68	M	78
O	70	N	86
P	27		
R	70		
S	50		



Slika 13: Profili DGGE pomnožkov genov za mikrobnjo 16S rRNK (desno) in dendrogrami podobnosti med profili (levo) pri pacientih H, K, L in O. Vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice ter črevesne vsebine so bili odvzeti: (i) pri pacientu H iz predela prečnega kolona (R1 in R2: adenom), (ii) pri pacientu K iz predela navzdolnjega kolona, (R: adenom), (iii) pri pacientu L iz predela slepega črevesa, (R1 in R2: adenokarcinom), (iv) pri pacientu O iz predela prečnega kolona, (R1: adenom, R2: adenokarcinom). Oznake pomenijo: »L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.



Slika 14: Profili DGGE pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNA (desno) in dendrogrami podobnosti med profili (levo) pri pacientih P, R in S. Vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice ter črevesne vsebine so bili odvzeti: (i) pri pacientu P iz predela prehoda med danko in esastim črevesom, (R1 in R2: adenokarcinom), (ii) pri pacientu R iz predela esastega črevesa, (R: adenom), (iii) pri pacientu S iz predela esastega črevesa, (R: adenom). Oznake pomenijo: »L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.



Slika 15: Profili DGGE pomnožkov genov za mikrobno 16S rRNK (desno) in dendrogrami podobnosti med profili (levo) pri pacientih I, J, M in N. Vzoreci nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice ter črevesne vsebine so bili odvzeti: (i) pri pacientu I iz predela navzgornjega kolona, (R1: adenom), (ii) pri pacientu J iz predela esastega črevesa, (R1 in R2: adenom), (iii) pri pacientu M iz predela danke, (R1: adenokarcinom), (iv) pri pacientu N iz predela navzdolnjega kolona, (R1 in R2: adenokarcinom). Oznake pomenijo: »L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Pri pacientih, kjer so bili odvzeti tudi vzorci črevesne vsebine, se DGGE profili po podobnosti uvrščajo bližje k profilom DGGE iz vzorcev nespremenjene črevesne sluznice pri pacientih H (86 %), L (93 %), M (86 %) in R (96 %), medtem ko se pri pacientih I (94 %), K (92 %), P (92 %) in S (73%) po podobnosti uvrščajo bližje k profilom DGGE iz vzorcev tumorsko spremenjene črevesne sluznice.

V dendrogrami pacientov smo vključili profil DGGE iz čiste kulture bakterije *F. nucleatum*, ki je na DGGE gelu imel dve lis. V profilih DGGE iz vzorcev pacientov na tem mestu ni sovpadajočih lis pri 12 pacientih (A - D, H - K, N - P in S) ali pa pri profilih DGGE iz vzorcev na sovpadajočem mestu ni vidnih sprememb v intenziteti lis med profili vzorcev nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice (pacienti L, M in R).

4.2.2 Ugotavljanje sprememb v številu *F. nucleatum* v vzorcih tumorsko spremenjene črevesne sluznice

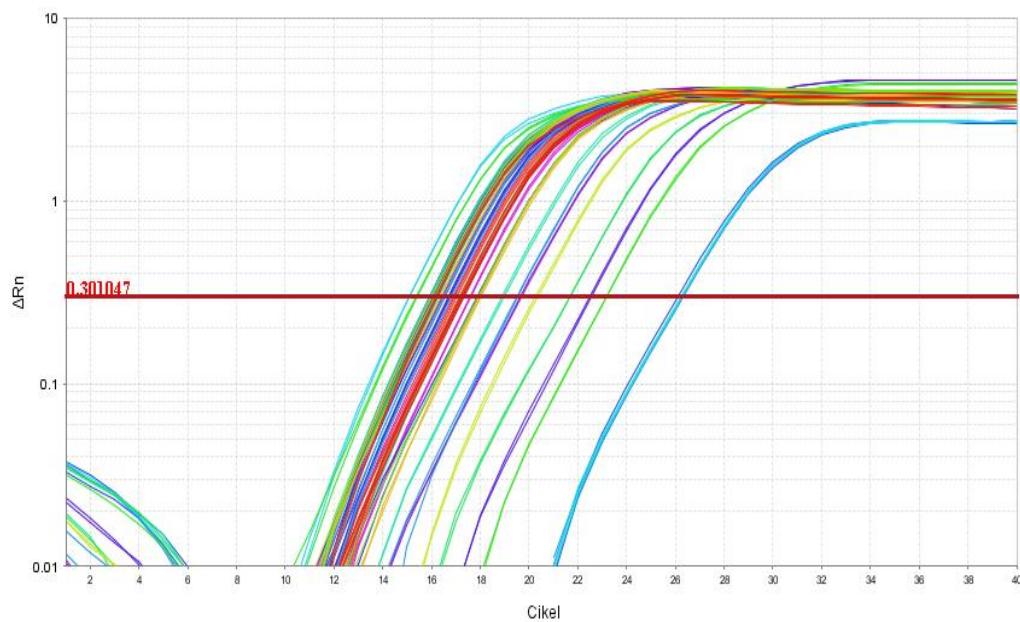
Kot je opisano v materialih in metodah (3.2.8 in 3.2.9), smo ugotavljali relativno stopnjo povečanja oziroma zmanjšanja v številu bakterij *F. nucleatum* v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa pacientov, glede na število teh bakterij v vzorcih nespremenjene sluznice istih pacientov.

Tako za SYBR Green qPCR, kot tudi za TaqMan qPCR, smo pripravili umeritveni krivulji. Za standard smo uporabili DNK osamljeno iz čiste kulture *F. nucleatum* s koncentracijo 3×10^6 celic/ml, ki smo jo pripravili, kot je opisano v materialih in metodah (3.2.3).

Umeritveno krivuljo za oba qPCR smo naredili v dvakratnih ponovitvah v razponu od 1 do 10^{-6} . Povprečna učinkovitost reakcij SYBR Green qPCR je bila 2,0; R^2 je bil 1. Povprečna učinkovitost reakcij TaqMan qPCR pa je bila 1,83; R^2 je bil 0,99.

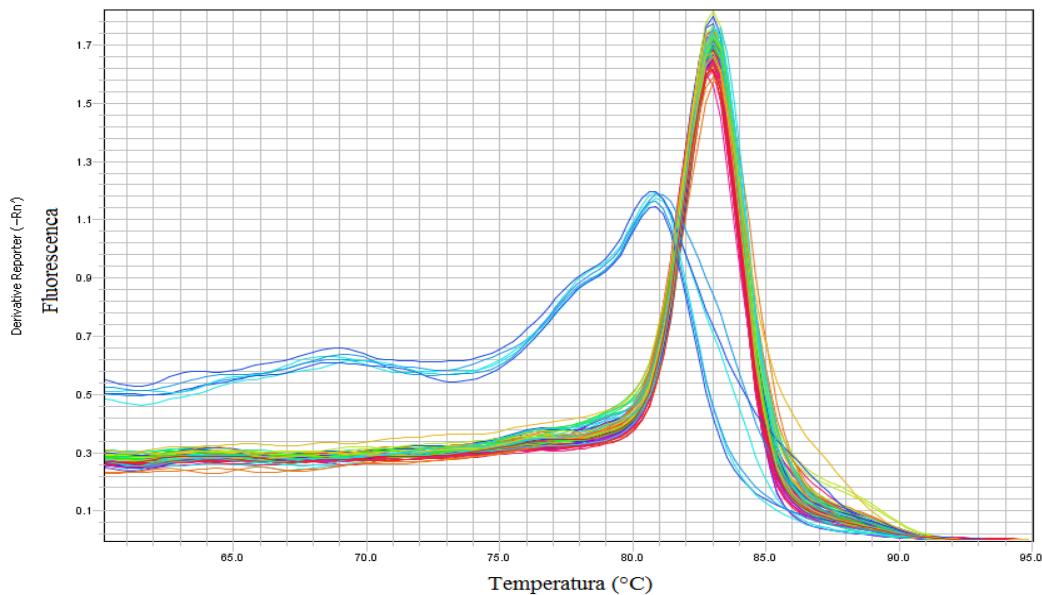
4.2.2.1 Ugotavljanje števila vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice s SYBR Green qPCR

Pri SYBR Green sistemu, s katerim smo ugotavljali število vseh bakterij v vzorcih, smo pri vseh analiziranih vzorcih odkrili signal. Ta signal je prestopal prag detekcije med 15. in 23. ciklom in se je pojavil vsaj 3 cikle pred signalom vzorca brez matrice (NTC; angl. no template control), ki je v poskusu predstavljal negativno kontrolo. Zabeležena relativna intenziteta fluorescence je prikazana spodaj (Slika 16).



Slika 16: Prikaz izmerjene fluorescence pri qPCR SYBR Green. Rdeča črta predstavlja ročno določen prag nad katerim je program zabeležil rezultat. Vzorci pacientov prestopijo ta prag med 15. in 23. ciklom. Okoli 26. cikla prestopijo prag tudi NTC.

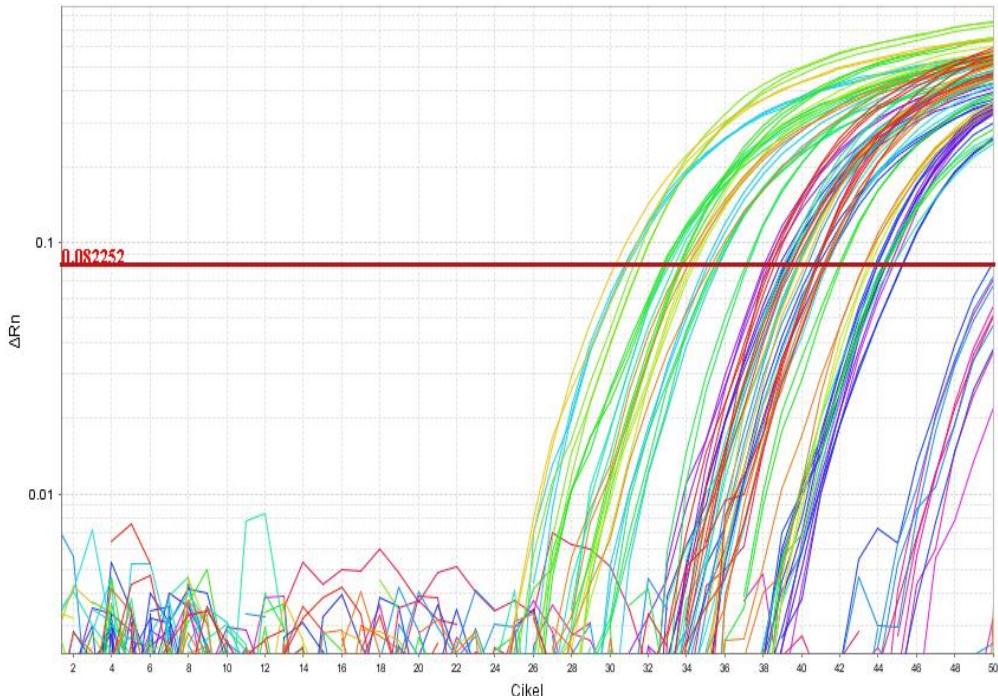
Talilna krivulja kaže nastanek specifičnega produkta, ki se razlikuje od produkta pri NTC (Slika 17). Izpiski programa oziroma neobdelani podatki SYBR Green qPCR so v prilogah (Priloga T).



Slika 17: Talilna krivulja pri qPCR SYBR Green. Na sliki sta vidna dva vrhova. Višji vrh predstavlja razpad pomnožkov genov za 16S rRNK bakterij v vzorcih črevesne sluznice. Nižji vrh predstavlja razpad nespecifičnih pomnožkov v NTC.

4.2.2.2 Ugotavljanje števila fuzobakterij v vzorcih črevesne sluznice s TaqMan qPCR

S TaqMan sistemom smo ugotavljali število bakterij iz rodu *Fusobacterium*. Zabeležena intenziteta fluorescence je prikazana spodaj (Slika 18).



Slika 18: Prikaz izmerjene fluorescence pri qPCR TaqMan. Rdeča črta predstavlja ročno določen prag nad katerim je program zabeležil rezultat. Vzorci pacientov prestopijo prag med 30. in 45. ciklom. Krivulje po 45. ciklu so pod mejo detekcije. Pod to mejo so tudi NTC, pri katerih ni prišlo do nastanka pomnožka.

Pri vzorcih pacientov, pri katerih smo zaznali signal, je ta prestopil prag detekcije med 30. in 45. ciklom. Takšni so bili vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene črevesne sluznice 10ih pacientov (A, C, D, G, I, L, M, N, P in S). Signal vzorcev, ki je prestopil prag detekcije po 45. ciklu, je bil pod mejo detekcije. V takšnih vzorcih smo namreč ugotovili manj kot 1 fuzobakterijsko tarčo. Primer, kjer je signal prestopil prag detekcije po 45. ciklu ali pa ga sploh ni prestopil, so bili vzorci obeh tipov pri pacientih B, O in R. Pri pacientih H in J je bil signal pod mejo detekcije samo pri tumorskih vzorcih, medtem ko je pri pacientu K bil signal pod mejo detekcije pri vzorcu nespremenjene sluznice. Da smo v analizo lahko vključili tudi te vzorce, smo tumorskima vzorcema pacientov H in J ter vzorcu nespremenjene sluznice pacienta K pripisali vrednost $\frac{1}{2}$ meje detekcije, kar pomeni $\frac{1}{2}$ fuzobakterijske tarče. Paciente B, O in R smo izključili iz nadaljnje analize. Izpisni programi oziroma neobdelani podatki TaqMan qPCR so v prilogah (Priloga U).

4.2.2.3 Izračun spremembe števila fuzobakterij v tumorsko spremenjeni črevesni sluznici V vzorcih pacientov, ki so pri TaqMan qPCR dali pozitiven signal, smo glede na rezultate SYBR Green qPCR, s katerim smo ugotavljali skupno število vseh bakterij, izračunali stopnjo spremembe v številu fuzobakterijskih tarč v tumorsko spremenjeni sluznici glede na nespremenjeno sluznico, kot je opisano v materialih in metodah (3.2.9). Rezultati so podani spodaj (Preglednica 6 in Slika 19). Preglednica z izračuni sprememb je v prilogah (Priloga S).

Preglednica 6: Stopnja spremembe v številu fuzobakterijskih tarč v tumorsko spremenjeni sluznici glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa oziroma danke preiskovanih pacientov. Pri pacientih, pri katerih je prišlo do zmanjšanja števila fuzobakterijskih tarč, so polja obarvana.

Patient	Primerjani vzorci	Nespremenjena sluznica (Bp)		Nespremenjena sluznica (Bp)		
		Normalizirana vrednost	Standardni odklon	Stopnja spremembe	Standardni odklon	Diagona
A	Bp4 : Bp3	1	0,14	1,5	0,40	bp
A	Bp4 : Bp2	1	0,14	2,2	0,27	bp
C	Bp2 : Bp1	1	0,30	1,9	0,53	bp
Tumorsko spremenjena sluznica (Rak)						
		Stopnja spremembe	Standardni odklon	Diagona		
C	Bp2 : Rak	1	0,30	21	6,79	adenom
D*	Bp : Rak1	1	0,21	3,1	0,66	adenom
D*	Bp : Rak4	1	0,21	9,7	1,99	adenom
G**	Rak1 : Rak4	1	0,01	0,8	0,15	adenokarcinom
H	Bp : Rak	1	0,12	0,0022	0,00031	adenom
I	Bp : Rak	1	0,34	46	11,3	adenom
J	Bp : Rak	1	0,33	0,018	0,0037	adenom
K	Bp : Rak	1	0,07	7,8	0,59	adenom
L	Bp : Rak	1	0,77	7,3	4,40	adenokarcinom
M	Bp : Rak	1	0,24	2,5	0,44	adenokarcinom
N	Bp : Rak	1	0,22	0,18	0,04	adenokarcinom
P	Bp : Rak	1	0,12	10,4	2,00	adenokarcinom
S	Bp : Rak	1	0,04	4,1	1,04	adenom

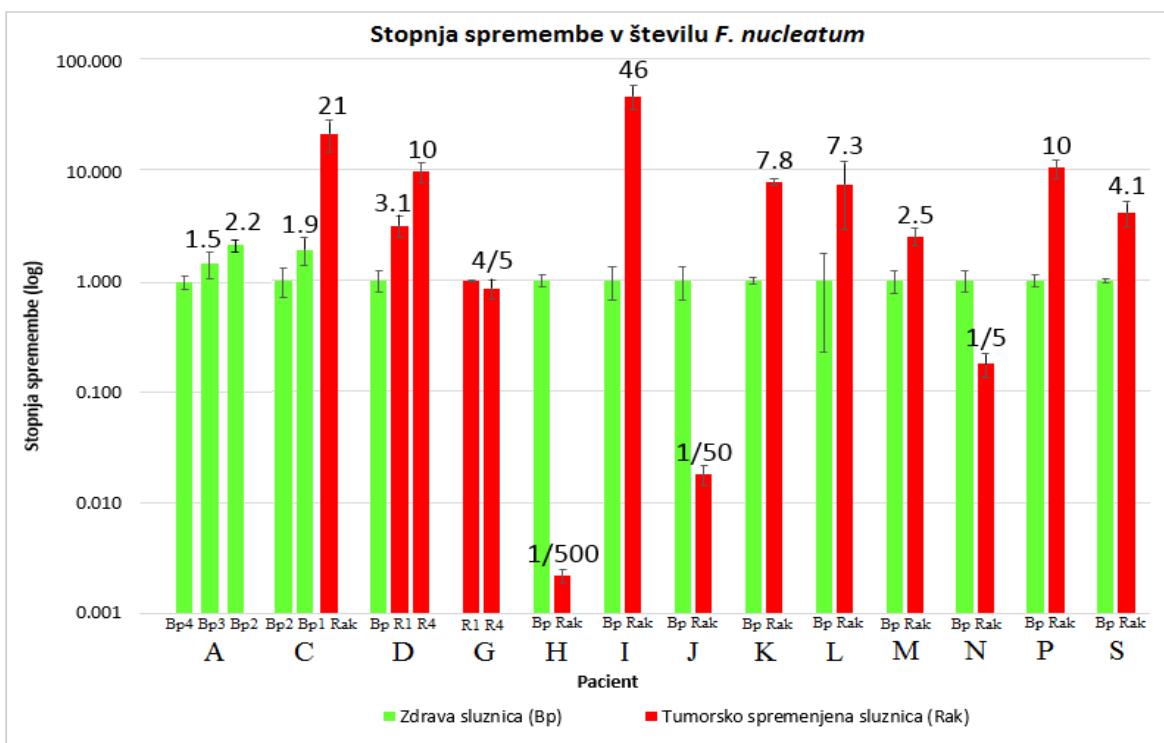
* Pacient D: pri tem pacientu sta bila iz različnih predelov črevesa odvzeta dva vzorca tumorsko spremenjene sluznice.

** Pacient G: pri tem pacientu ni bil odvzet vzorec nespremenjene sluznice, zato smo primerjavo opravili med vzorcem R1 (adenom) in vzorcem R4 (adenokarcinom).

Pri pacientih A, C in D so bili vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice odvzeti iz različnih predelov debelega črevesa. Vzorci nespremenjene sluznice pacientov A in C so normalizirali glede na vzorec z najnižjim ugotovljenih številom fuzobakterijskih tarč. Pri obeh pacientih med vzorci nespremenjene sluznice ni sprememb v številu fuzobakterijskih tarč. Spremembe v številu so vidne pri primerjavi vzorcev nespremenjene

in tumorsko spremenjene sluznice pri pacientu C in v obeh primerih primerjave vzorcev nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice pri pacientu D.

Pri devetih pacientih (H, I, J, K, L, M, N, P in S), kjer so bili vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice odvzeti iz istega predela debelega črevesa ozziroma danke, je ugotovljeno število fuzobakterijskih tarč v vzorcih nespremenjene sluznice povprečeno in primerjano s številom fuzobakterijskih tarč v vzorcih tumorsko spremenjene črevesne sluznice. Do povečanja števila fuzobakterijskih tarč v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice je prišlo pri šestih pacientih (I, K, L, M, P in S), do zmanjšanja pa pri treh pacientih (H, J in N). Pri pacientu G, pri katerem ni bil odvzet vzorec nespremenjene črevesne sluznice, med tumorskima vzorcema ni opazne razlike v številu fuzobakterijskih tarč.



Slika 19: Prikaz stopnje spremembe števila bakterij *F. nucleatum* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa pacientov. Podatki so prikazani na logaritemski skali in so normalizirani glede na vzorce nespremenjene sluznice. Vrednosti na vrhu stolpcev prikazujejo stopnjo spremembe. Vrednosti pod 1 so za lažje razumevanje zapisane z ulomkom. Oznaka »Bp« pomeni vzorec sluznice debelega črevesa brez spremembe (stolpec zelene barve), oznaka »R« pomeni tumorsko spremenjen vzorec sluznice debelega črevesa (stolpec rdeče barve).

Rezultati Wilcoxon testa so pokazali, da pri preiskovanih pacientih ni statistično značilnega povečanja ozziroma zmanjšanja števila fuzobakterijskih tarč v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice, glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa in danke ($P = 0,084$). Tako se pokaže tudi, če primerjamo le vzorce sedmih pacientov (C, D, H, I, J, K in S) z diagnozo adenoma ($P = 0,26$), kot tudi pri primerjavi štirih pacientov (L, M, N in P) z diagnozo adenokarcinoma ($P = 0,14$). Izračuni programa SPSS so v prilogah (Priloga V).

5 RAZPRAVA

Mikrobioti sluznice debelega črevesa in črevesne vsebine pacientov s kolorektalnim rakom smo analizirali z molekularnimi metodami. Poleg razlik v sestavi črevesne mikrobiote v vzorcih so nas zanimale tudi morebitne spremembe v številu bakterij *Fusobacterium nucleatum* v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice, glede na okoliško nespremenjeno sluznico debelega črevesa oz. danke.

Koščki tumorsko spremenjene in nespremenjene črevesne sluznice ter črevesna vsebina pacientov s kolorektalnim rakom so enkratni vzorci, pridobljeni z metodo kolonoskopije. Vzorce smo pridobili iz Kliničnega oddelka za gastroenterologijo, UKC Ljubljana, med marcem in septembrom 2013. Ker so bili odvzeti ob rutinskih pregledih pacientov, smo morali na primerne vzorce čakati. Zaradi tega smo v začetku študije v analizo žeeli vključiti vzorce človeške sluznice debelega črevesa in danke iz zbirke Kliničnega oddelka za gastroenterologijo, ki so bili odvzeti med predhodnimi pregledi in shranjeni v fiksativu formalinu.

Izkazalo se je, da je osamitev mikrobne DNK iz v formalinu shranjenih vzorcev težavna. Avtorji več študij so poročali o bistveno slabši uspešnosti osamitve DNK iz vzorcev, ki so bili shranjeni v formalinu, kot iz svežih ali zamrznjenih vzorcev (Vachot in Monnerot, 1996; Rodriguez in sod., 2002). Izvedene so bile študije s katerimi so pokazali, da pri v formalinu shranjenih vzorcih pride do povezav med proteini in DNK. Primer so povezave med DNK in histoni v evkariontskih celicah (Brutlag in sod., 1969). Vzrok za oteženo osamitev mikrobne DNK iz vzorcev v formalinu je tudi v tem, da formalin skozi čas povzroča propadanje mikrobnih celic (Parvathi in sod., 2011). Zaradi majhnega števila dostopnih vzorcev pacientov, ki smo jih imeli na razpolago, smo opravili optimizacijo metod in postopkov osamitve skupne mikrobne DNK večinoma na vzorcih sluznice kunčjega debelega črevesa. Pri delu smo uporabili metodo za osamitev DNK iz vzorcev v formalinu, kot sta jo opisala Vachot in Monnerot (1996) in so jo dopolnili Rodriguez in sodelavci (2002). Za osamitev DNK iz zamrznjenih vzorcev smo uporabili metodo z ultrazvočnim razbijanjem celic. Po osamitvi DNK ter opravljeni metodi PCR in DGGE metodi smo odkrili, da so se pri zamrznjenih vzorcih profili mikrobiote med kunčjimi in človeškimi vzorci razlikovali, medtem ko so bili profili pri vzorcih v formalinu med sabo enaki, ne glede na vrsto vzorca. Zaradi tega smo sklepali, da nastale lise pri vzorcih v formalinu ne odražajo profilov tam prisotne mikrobiote. Poleg zgoraj naštetih negativnih vplivov formalina na uspešnost osamitve mikrobne DNK, je dodatno težavo predstavljal prvi korak metode osamitve. Da smo odstranili ostanke formalina, smo morali namreč vzorce najprej večkrat sprati v TE pufru. Tako lahko dodatno zmanjšamo število na sluznici prisotnih bakterij. Zaradi zgoraj našteteega smo opustili idejo o analiziranju v formalinu shranjenih vzorcev. Nadalje smo pri delu uporabljali zamrznjene vzorce sluznice človeškega debelega črevesa ter črevesne vsebine, kot so jih uporabljali tudi avtorji ostalih študij s to tematiko (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011, 2013; Marchesi in sod., 2011).

Na podlagi rezultatov iz točke 4.1.2 smo za osamitev skupne mikrobne DNK iz vzorcev pacientov izbrali metodo z ultrazvočnim razbijanjem celic. Razlogi so v tem, da pri metodi kemične lize celic po končani lizi v mikrocentrifugirki nismo več opazili intaktnega koščka kunčje sluznice, medtem ko je ta ostal opazen pri ostalih metodah. Na podlagi tega sklepamo, da so večje lise genomske DNK pri vzorcih, kjer smo skupno DNK osamili s proteinazo K in jih ne opazimo pri ostalih metodah, evkariontskega izvora. Večja količina evkariontske DNK lahko povzroči zmanjšanje učinkovitosti PCR reakcije, kar se vidi tudi pri vzorcu sluznice tretirane s proteinazo K velikosti 16 mm^2 . Pri primerjanju metod s krogličnim in ultrazvočnim razbijalcem smo dali prednost slednji, saj uporaba krogličnega razbijalca z zmanjšano močjo stresanja do te mere, da po stresanju ostane viden košček sluznice, zmanjša tudi učinkovitost osamitve mikrobne DNK iz vzorcev. Pri metodi z ultrazvočnim razbijalcem pa lahko s spremjanjem amplitude in časa delovanja ultrazvočnega razbijalca uspešno kontroliramo stopnjo razbitja koščka sluznice in s tem sprostitev evkariontske DNK, pri tem pa še vedno zagotovimo sprostitev DNK iz bakterij. To je bil tudi glavni razlog, zakaj nismo pri analizi vzorcev pacientov uporabili katerega izmed testiranih komercialnih kitov.

Z izbrano metodo osamitve mikrobne DNK z ultrazvočnim razbijalcem smo se lotili analize vzorcev pacientov. Od 18 preiskovanih pacientov smo skupno mikrobno DNA uspešno osamili pri 16. Vzrok, da pri pacientih E in F osamitev ni uspela, je verjetno v tehnični napaki pri delu. Poleg velike količine sproščene evkariontske DNK, je potrebno upoštevati, da je na površini približno 9 mm^2 velikih biopsijskih koščkov sluznice le med 10^5 do 10^6 bolj ali manj pritrjenih bakterijskih celic (Zoetendal in sod., 2002).

Za opredelitev razlik v sestavi mikrobiote v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice debelega črevesa in črevesne vsebine, smo uporabili molekularno metodo DGGE. To metodo so v svoji študiji na vzorcih sluznice debelega črevesa uporabili tudi Green in sodelavci (2006).

Različni DGGE profili pomnožkov genov za mikrobno 16S rRNA odražajo različno sestavo mikrobiote v preiskovanih vzorcih. Profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti v istem predelu debelega črevesa ali danke, na medsebojni razdalji 5 cm, so med sabo zelo podobni ($88 \pm 9\%$). Razlogi, da se ti vzorci v dendrogramu ne uvrstijo v gruče s podobnostjo 100 %, so lahko: (i) razlike v uspešnosti osamitve mikrobne DNK iz vzorcev, (ii) pri pomnoževanju s PCR lahko pride do nastanka lažnih pomnožkov ozioroma artefaktov, (iii) v teh vzorcih nespremenjene črevesne sluznice, ki so medsebojno oddaljeni 5 cm, ni popolnoma enake sestave mikrobiote.

Pri pacientih A, B in C se profili DGGE iz vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti vzdolž prebavnega trakta, uvrščajo skupaj s povprečno podobnostjo $85 \pm 8\%$. Izjema je vzorec Bp4 pacienta A. Ta vzorec smo izključili iz izračuna povprečne podobnosti profilov DGGE med vzorci, odvzetimi na različnih mestih prebavnega trakta, saj v tem primeru ne

gre za nespremenjeno črevesno sluznico, ampak za divertikle črevesne sluznice pri pacientu z diagnozo sindroma razdražljivega črevesa. Eden izmed možnih vzrokov tega sindroma je porušena sestava v bakterijski mikrobioti (McFarland in Dublin, 2008), kar bi lahko bil tudi vzrok, zakaj se DGGE profil tega vzorca po podobnosti ne uvrsti k profilom ostalih vzorcev istega pacienta.

Primerjava podobnosti med profili DGGE iz vzorcev nespremenjene sluznice, odvzetimi vzdolž prebavnega trakta ($85 \pm 8\%$), s podobnostjo med profili DGGE iz vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz istega predela prebavnega trakta ($88 \pm 9\%$), nakazuje, da se podobnost sestave mikrobiote vzdolž debelega črevesa ne razlikuje bistveno od podobnosti v sestavi mikrobiote iz istega dela debelega črevesa ($P = 0,98$). Na podlagi tega sklepamo na določeno stabilnost v sestavi mikrobiote vzdolž distalnega dela prebavnega trakta oziroma vsaj debelega črevesa. Res je, da smo pri našem delu analizirali zelo omejeno število vzorcev, vendar o takšni stabilnosti mikrobiote poročajo avtorji več študij, med drugimi Zoetendal in sodelavci (2002), Eckburg in sodelavci (2005), Green in sodelavci (2006) ter Costello in sodelavci (2009). Po drugi stani pa se sestava mikrobiote v vzorcih nespremenjene sluznice debelega črevesa pri različnih pacientih razlikuje. O tem med drugim poročajo Green in sodelavci (2006), Rajilić - Stojanović in sodelavci (2009), Tap in sodelavci (2009) ter Claesson in sodelavci (2011). Da je sestava črevesne mikrobiote med različnimi osebami različna, nakazujejo tudi naši rezultati v točki 4.2.1.1.

Med kolonoskopijo so bili osmim preiskovanim pacientom odvzeti tudi vzorci črevesne vsebine. Pri ljudeh se po nekaterih študijah sestava mikrobiote fecesa razlikuje od mikrobiote sluznice debelega črevesa. O tem so poročali Zoetendal in sodelavci (2002), Eckburg in sodelavci (2005), Momozawa in sodelavci (2011) ter Walker in sodelavci (2011). Vendar biološki pomen teh razlik še ni jasen. V naši študiji so se profili DGGE mikrobiote iz vzorcev črevesne vsebine preiskovanih pacientov po podobnosti uvrstili bodisi k profilom DGGE mikrobiote iz nespremenjene ali pa iz tumorsko spremenjene sluznice. Vzrok je lahko, da preiskovana črevesna vsebina ni bila odvzeta po iztrebljanju pacienta, ampak so bili vzorci odvzeti med samim potekom kolonoskopije iz žepov debelega črevesa preiskovanih pacientov. V teh žepih je po postopku izpiranja pacienta pred preiskavo namreč ostalo nekaj črevesne vsebine. Tako je možno, da je bila pri odvzemu, poleg črevesne vsebine, posesana tudi površina sluznice, oziroma, da je bila površina odvzetih vzorcev črevesne sluznice onesnažena s črevesno vsebino.

V nadaljevanju smo želeli preveriti ali se sestava mikrobiote, ki naseljuje nespremenjeno zdravo sluznico debelega črevesa pacientov s kolorektalnim rakom razlikuje od tiste, ki naseljuje tumorsko spremenjeno sluznico. Vodilo nam je bila predpostavka, da ima mikrobiota aktivno vlogo pri patogenezi kolorektalnega raka, posledično bodo »odgovorni« mikrobi v tumorskem mikrookolju prisotni in zato se bo struktura mikrobiote tumorja razlikovala od mikrobiote sosednjega zdravega tkiva (Marchesi in sod., 2011). Primerjali smo sestavo mikrobiote v nespremenjeni in tumorsko spremenjeni črevesni sluznicu pri 12 pacientih. Različna sestava v mikrobioti se odraža v različnih DGGE profilih pomnožkov genov za mikrobeno 16S rRNK. Na podlagi opažanja, da so bili profili v vzorcih nespremenjene sluznice pri posameznih pacientih najmanj 78 % podobni, smo za razliko v sestavi mikrobiote med tumorsko spremenjeno ter nespremenjeno sluznico distalnega dela črevesa postavili arbitrarno mejo 75 %. Po tem kriteriju rezultati iz točke 4.2.1.2 nakazujejo spremembe v sestavi mikrobiote pri 8 od 12 pacientov. Za primerjavo smo izračunali povprečen odstotek podobnosti med vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice, ki je znašal $65 \pm 20\%$. Na podlagi rezultatov Mann-Whitney testa ugotavljamo, da se podobnost profilov DGGE med vzorci nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice statistično značilno razlikuje od podobnosti profilov DGGE samo med vzorci nespremenjene sluznice ($P < 0,01$).

V drugem sklopu analize vzorcev sluznice debelega črevesa preiskovanih pacientov smo želeli preveriti ali pride v tumorsko spremenjeni sluznici, glede na nespremenjeno sluznico, do povečanja števila bakterije *Fusobacterium nucleatum*, kot o tem poroča več študij (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011, 2013; Rubinstein in sod., 2013). Z metodo DGGE pri vzorcih tumorsko spremenjene sluznice nismo odkrili jasnih lis, ki bi sovpadale z lisama, ki nastaneta pri DGGE analizi čiste kulture bakterije *F. nucleatum*. V primeru, da sta bili lisi prisotni, tako v vzorcu nespremenjene, kot tudi tumorsko spremenjene sluznice, pa ni bilo opaznih razlik v njihovi intenziteti. Tako na podlagi teh metode ne moremo potrditi sprememb oziroma razlik v številu bakterije *F. nucleatum* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice. Zato smo se odločili, da bomo vzorce analizirali s kvantitativno metodo qPCR, ki so jo v svojih študijah uporabili tudi Kostic in sodelavci (2011) ter Castellarin in sodelavci (2011).

Ker metoda osamitve mikrobne DNK, ki smo jo uporabili pri našem delu, ni avtomatizirana, lahko pri njeni izvedbi prihaja do napak (npr. različno veliki preneseni volumni pri čiščenju DNK). Te napake vodijo do razlik v količini uspešno osamljene mikrobne DNK. Za normalizacijo teh razlik smo z metodo qPCR z bakterijskimi univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi ocenili skupno število bakterijskih tarč v posameznih vzorcih. S specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondijo TaqMan za rod *Fusobacterium* smo nato s qPCR metodo v vzorcih ugotavljali število fuzobakterijskih tarč. Pri tem smo predpostavili, da trend povečanja oziroma upadanja števila fuzobakterijskih tarč v vzorcih sluznice sovpada s povečanjem oziroma upadanjem števila bakterij *F. nucleatum* (Tahara in sod., 2014). Za standard pri qPCR metodi smo uporabili čisto kulturo *F. nucleatum*, pri kateri smo v

eksponentni fazi rasti z direktnim štetjem pod mikroskopom ugotavljal število celic/ml. Predpostavili smo, da bo v eksponentni fazi rasti najvišje razmerje med živimi in mrtvimi bakterijskimi celicami. Zaradi razpada mrtvih celic pod mikroskopom namreč ne vidimo, medtem ko je lahko iz njih sproščena DNK še vedno prisotna v vzorcu. Tako s qPCR metodo pri določenih vzorcih odkrijemo močnejši signal, kot če v vzorcu ne bi bilo prisotne DNK mrtvih celic. Ker do izgub DNK prihaja tudi med postopkom njene osamitve, ne vemo zagotovo, ali dobljeni signal pri standardu v qPCR metodi res popolnoma sovpada s preštetimi celicami *F. nucleatum*. Zato v poskusu nismo poskušali absolutno kvantificirati števila fuzobakterij v preiskovanih vzorcih. Ker pa smo pri ugotavljanju števila fuzobakterijskih tarč s qPCR TaqMan metodo pri vseh vzorcih uporabili isti standard, lahko relativno primerjamo spremenjanje števila fuzobakterij med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene črevesne sluznice.

Signal fuzobakterij smo zaznali pri 12 od 15 pacientov. Rezultati sovpadajo z rezultati študije Tahare in sodelavcev (2014), kjer tudi niso zaznali signala pri vseh preučevanih pacientih. Vzroki so lahko bodisi metodološke napake bodisi je bilo število fuzobakterijskih tarč pod mejo detekcije uporabljene metode.

Rezultati iz točke 4.2.2 pri pacientih A in C, kjer smo zaznali signal fuzobakterij v vzorcih nespremenjene sluznice iz različnih mest prebavnega trakta, nakazujejo, da se število fuzobakterij v vzorcih nespremenjene sluznice vzdolž distalnega dela prebavnega trakta bistveno ne razlikuje. To bi lahko potrdilo trditve o stabilnosti mikrobiote, kot so pokazali tudi rezultati DGGE v točki 4.2.1. Zanimivo je, da smo fuzobakterijski signal odkrili tudi pri pacientu A, pri katerem ni bilo tumorsko spremenjene sluznice. Vzrok je lahko prisotnost komenzalnih fuzobakterij v debelem črevesu (Allen-Vercoe in sod., 2011) ali pa sindrom razdražljivega črevesa in s tem povezana porušena sestava v bakterijski mikrobioti (McFarland in Dublin, 2008).

Pri pacientih, pri katerih smo zaznali fuzobakterijske tarče v vzorcih tumorsko spremenjene in nespremenjene črevesne sluznice, smo izračunali relativno stopnjo povečanja ozira zmanjšanja števila fuzobakterij. Rezultati iz točke 4.2.2 pri različnih pacientih nakazujejo povečanje, kot tudi zmanjšanje števila fuzobakterij v nekaterih vzorcih tumorsko spremenjene sluznice, glede na nespremenjeno sluznico. Na podlagi rezultatov Wilcoxon testa sklepamo, da pri preiskovanih pacientih v celoti ni statistično značilnega povečanja ali zmanjšanja v številu fuzobakterijskih tarč v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice, glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa in danke ($P = 0,084$). To ne sovpada z rezultati študij v katerih so pokazali statistično značilno povečanje števila bakterij iz rodu *Fusobacterium*, kot samo bakterije *F. nucleatum*, v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice (Castellarin in sod., 2011; Kostic in sod., 2011; McCoy in sod., 2013; Tahara in sod., 2014). Tudi pri osmih pacientih, pri katerih smo odkrili v povprečju $12 \times$ povečanje števila fuzobakterij v tumorskih vzorcih, to ne korelira s $400 \times$ povečanjem števila fuzobakterij, kot o tem poročajo Castellarin in sodelavci (2011).

Morebitni vzroki, da pri preiskovanih pacientih v naši študiji ni tako jasnih sprememb v številu fuzobakterij, so navedeni v nadaljevanju. (i) Možen vzrok je lahko navzkrižna kontaminacija vzorcev ob odvzemu ali pa med izvedbo analize pri posameznih pacientih. Rezultati DGGE nakazujejo, da temu vsekakor ni tako pri vseh preiskovanih pacientih. Sklepamo namreč, da se odstotek podobnosti profilov DGGE med vzorci tumorsko spremenjene in nespremenjene sluznice, generalno ne bi statistično razlikoval od odstotka podobnosti profilov DGGE med vzorci nespremenjene sluznice ($P < 0,01$) v primeru navzkrižne kontaminacije vzorcev pri vseh pacientih, (ii) Vzrok, da nismo zaznali povečanja števila fuzobakterij pri tumorskih vzorcih, je lahko vzrok v tem, da so to okolje prerasle druge bakterije, ki jih tako kot fuzobakterije, uvrščamo v skupino »bakterijskih potnikov razvoja kolorektalnega raka« (Tjalsma in sod., 2012). Primer so bakterije rodov *Coriobacteridae*, *Roseburia*, in *Faecalibacterium* (Marchesi in sod., 2011). To bi med drugim lahko pojasnilo rezultate pri pacientih H, J in N, kjer smo ugotovili zmanjšanje števila fuzobakterij v tumorskih vzorcih. Da je prišlo do zmanjšanja števila fuzobakterij v določenih tumorskih vzorcih, so pokazali tudi McCoy in sodelavci (2013) ter Tahara in sodelavci (2014). Kljub temu so avtorji obeh omenjenih študij drugače kot v naši študiji statistično zanesljivo pokazali generalno povečanje števila fuzobakterij v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice glede na celotno skupino preiskovanih pacientov. (iii) Vzrok za ugotovljeno zmanjšanje števila fuzobakterij v tumorskih vzorcih preiskovanih pacientov bi lahko bila tudi metodološka napaka. Obstaja namreč možnost, da smo pri razdelitvi večjih vzorcev tumorsko spremenjene sluznice za analizo odvzeli košček, ki ni vseboval same površine sluznice in s tem tam prisotnih bakterij, temveč pretežno notranje tkivo sluznice brez bakterij. To bi lahko pomenilo, da so široko specifični začetni oligonukleotidi ki smo jih uporabljali pri namnoževanju bakterijskih genov za 16S rRNK, zaradi pomanjkanja bakterijske DNK, nalegali tudi na evkariontsko DNK in tako dali lažno pozitiven signal in s tem napačno oceno števila v vzorcu prisotnih bakterijskih tarč. Za razjasnitev tega problema bi bile potrebne dodatne raziskave.

Tudi primerjava v številu fuzobakterij med adenomom in karcinomom pri pacientu G nakazuje, da med vzorcema ni razlik. To bi lahko pomenilo prisotnost fuzobakterij že v začetni fazi adenoma (Kostic in sod., 2013; Rubinstein in sod., 2013), vendar bi bilo za potrditev tega opažanja potrebno v raziskavo vključiti dodatne paciente. Da med preiskovanimi vzorci ni signifikantnih razlik v številu fuzobakterij se kaže tako pri primerjavi vzorcev z diagnozo adenoma ($P = 0,26$), kot tudi pri primerjavi vzorcev z diagnozo adenokarcinoma ($P = 0,14$). Tako na podlagi naših rezultatov ne moremo sklepati ali imajo fuzobakterije vidno vlogo že v zgodnjih fazah razvoja kolorektalnega raka (stanje adenoma) (Kostic in sod., 2013) ali pa se kot predstavniki »bakterijskih potnikov razvoja kolorektalnega raka«, razrastejo v tumorskem mikrookolju v poznih fazah razvoja kolorektalnega raka (stanje adenokarcinoma) (Tjalsma in sod., 2012).

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov našega raziskovalnega dela lahko sklepamo naslednje:

- Iz v formalinu fiksiranih vzorcev ne moremo osamiti mikrobne DNK, ki bi bila primerna za nadaljnje analize, zato potrebujemo za raziskavo sestave mikrobiote, ki naseljuje črevesno sluznico sveže ali zamrznjene vzorce.
- Sestava mikrobiote, ki naseljuje črevesno sluznico vzdolž debelega črevesa je razmeroma nespremenjena, je pa različna pri različnih pacientih.
- Mikrobiota nespremenjene oz. »zdrave« sluznice debelega črevesa se razlikuje od mikrobiote tumorsko spremenjene sluznice.
- Kljub opaženim spremembam pri preiskovanih pacientih, statistično značilnega povečanja števila fuzobakterij v vzorcih tumorsko spremenjene črevesne sluznice nismo uspeli potrditi.
- Prav tako nismo pokazali povezave fuzobakterij z zgodnejšimi stadiji raka t.j. adenoma ali s poznejšimi stadiji t.j. adenokarcinoma.

7 POVZETEK

Kljub temu, da zaenkrat še ni popolnoma jasno ali do sprememb v sestavi črevesne mikrobiote pride zaradi razvoja kolorektalnega raka ali spremembe v črevesni mikrobioti pripomorejo k razvoju raka, postaja vedno bolj očitno, da pri bolnikih s kolorektalnim rakom prihaja do določenih sprememb v sestavi njihove črevesne mikrobiote. Morebitne spremembe v sestavi mikrobiote ter spremembe v številu bakterij iz rodu *Fusobacterium*, smo odkrivali tudi v naši študiji.

Pri delu smo analizirali vzorce sluznice debelega črevesa in črevesne vsebine 16 pacientov, pri katerih so bili opravljeni kolonoskopski pregledi zaradi suma nastanka kolorektalnega raka ali pa so bili pregledani v sklopu rutinskih postoperativnih pregledov. Vzorce smo pridobili iz Kliničnega oddelka za gastroenterologijo, UKC Ljubljana.

Ker smo imeli na razpolago zelo majhno število primernih vzorcev, smo optimizacijo metod in postopkov osamitve skupne mikrobne DNK opravili na modelnih vzorcih, t.j. sluznice kunčjega debelega črevesa. V prvem delu smo ugotovili, da iz v formalinu fiksiranih vzorcev ne uspemo osamiti dovolj kvalitetne mikrobne DNK, ki bi omogočala uspešno nadaljnjo analizo. Vzrok je lahko več: (i) zaradi formalina pride do navzkrižnih povezav med proteini in DNK, kar onemogoča osamitev dovolj čiste DNK, (ii) bakterije v formalinu propadajo in z njimi tudi njihove biološke makromolekule (DNK). Med preizkušenimi metodami osamitve DNK iz zamrznjenih vzorcev smo izbrali metodo, ki vključuje fizikalno razbijanje celic s ultrazvočnim razbijjalcem. Pri tej metodi smo lahko uspešno kontrolirali stopnjo razbitja črevesne sluznice in s tem zmanjšali količino sproščene evkariontske DNK, pri tem pa še vedno zagotovili učinkovito lizo mikrobnih celic in sprostitev mikrobne DNK. Prevelika količina sproščene evkariontske DNK lahko namreč negativno vpliva na uspešnost izvedbe nadaljnjih molekularnih metod (PCR, DGGE, qPCR).

V nadaljevanju smo z molekularno metodo elektroforeze s PCR pomnoženih delov bakterijskih genov za 16S rRNK v denaturacijskem gradientu (DGGE), ki omogoča profiliranje sestave mikrobiote, odkrivali morebitne spremembe v sestavi mikrobiote, ki naseljuje nespremenjeno (»zdravo«) in tumorsko spremenjeno črevesno sluznico. Pri pacientih, pri katerih je bila odvzeta še črevesna vsebina, smo v analizo vključili tudi to. Čeprav se zavedamo, da bi bilo potrebno za dokončno potrditev v študijo vključiti večje število pacientov, lahko na podlagi rezultatov DGGE metode oblikujemo sledeče zaključke: (i) DGGE profili nespremenjene sluznice med različnimi pacienti se razlikujejo, kar nakazuje da je sestava črevesne mikrobiote med preiskanimi osebami različna; (ii) Podobnost med DGGE profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz istega predela prebavnega trakta, je primerljiva s podobnostjo med DGGE profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz različnih predelov prebavnega trakta istega pacienta. To nakazuje, da je mikrobiota vzdolž distalnega dela prebavnega trakta razmeroma

stabilna; (iii) Podobnost DGGE profilov tumorsko spremenjene sluznice z DGGE profili nespremenjene (»zdrave«) sluznice je manjša kot podobnost DGGE profilov iz nespremenjene (»zdrave«) sluznice. Slednje nakazuje, da je v okolju tumorsko spremenjene črevesne sluznice tudi sestava mikrobiote drugačna kot v okolju nespremenjene (»zdrave«) črevesne sluznice.

Zaradi nedavnih objav, v katerih so avtorji poročali o povezavi bakterij iz rodu *Fusobacterium* in med njimi posebej vrste *Fusobacterium nucleatum* z nastankom kolorektalnega raka, smo poskušali z metodo qPCR (TaqMan) ugotoviti morebitne spremembe v številu fuzobakterij v vzorcih tumorsko spremenjene črevesne sluznice iz preiskovanih pacientov. Pri tem smo razlike v količini osamljene mikrobne DNK med vzorci normalizirali z metodo qPCR (SYBR Green), s katero smo ugotavljali število vseh na črevesni sluznici prisotnih bakterij. Ugotovili smo, da se število fuzobakterij v vzorcih nespremenjene sluznice vzdolž distalnega dela prebavnega trakta pri istem pacientu ne spreminja statistično značilno, kar bi lahko potrdilo trditve o stabilnosti mikrobiote v tem delu prebavnega trakta. Rezultati pa nakazujejo razlike v številu fuzobakterij v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice glede na nespremenjeno (»zdravo«) sluznico, vendar v celoti povečanje v številu fuzobakterij v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice ni statistično značilno. Tako na podlagi naših rezultatov tudi ne moremo sklepati ali imajo fuzobakterije vidno vlogo že v zgodnjih fazah razvoja kolorektalnega raka ali pa se kot predstavniki »bakterijskih potnikov razvoja kolorektalnega raka«, razrastejo v tumorskem mikrookolju šele v poznih fazah razvoja kolorektalnega raka.

V tem delu smo predstavili le košček mozaika, ki predstavlja celotno sliko vzročno-posledičnih povezav med kolorektalnim rakom in črevesno mikrobioto. Pri tem smo naleteli na določene težave, ki smo jih morali podrobnejše raziskati, da smo lahko nadaljevali z delom. V prihodnje bi bilo smiselno v študijo vključiti večje število pacientov in v analizo uvesti tudi metodo sekvenciranja informativnih delov mikrobnih genomov, ki ob sicer še vedno precej višjih stroških ponuja bolj zanesljive in informativne podatke.

8 VIRI

- Ahn J., Sinha R., Pei Z., Dominianni C., Wu J., Shi J., Goedert J.J., Hayes R.B., Yang L. 2013. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 105, 24: 1907-1911
- Allen-Vercoe E., Strauss J., Chadee K. 2011. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes*, 2, 5: 294-298
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59, 1: 143-169
- Boutaga K., van Winkelhoff A.J., Vandebroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H. 2005. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45, 2: 191-199
- Brook I., de Leyva F. 1994. Microbiology of tonsillar surfaces in infectious mononucleosis. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 148, 2: 171-173
- Brutlag D., Schlehuber C., Bonner J. 1969. Properties of formaldehyde-treated nucleohistone. *Biochemistry*, 8, 8: 3214-3218
- Carey C.M., Kirk J.L., Ojha S., Kostrzynska M. 2007. Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 5: 537-550
- Castellarin M., Warren R.L., Freeman D.J., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., Barnes R., Watson P., Allen-Vercoe E., Moore R.A., Holt R.A. 2011. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22, 2: 299-306
- Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 5960: 1694-1697
- Cover T.L., Blaser M.J. 2009. *Helicobacter pylori* in health and disease. *Gastroenterology*, 136, 6: 1863-1873
- Claesson M.J., Cusack S., O'Sullivan O., Greene-Diniz R., de Weerd H., Flannery E., Marchesi J.R., Falush D., Dinan T., Fitzgerald G., Stanton C., van Sinderen D., O'Connor M., Harnedy N., O'Connor K., Henry C., O'Mahony D., Fitzgerald A.P., Shanahan F., Twomey C., Hill C., Ross R.P., O'Toole P.W. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1: 4586-4591
- DSMZ. 2009. 104. PYG medium (modified). Braunschweig, Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH: 1 str.
http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium104.pdf
(junij, 2014)
- DuPont H.L. 2009. Bacterial diarrhea. *New England Journal of Medicine*, 361, 16: 1560-1569

- Dzink J.L., Sjeenan M.T., Socransky S.S. 1990. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., norn. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., norn. rev., comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 40, 1: 74-78
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, 308, 5728: 1635-1638
- Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47: 590-592
<http://www.bacterio.net> (junij, 2014)
- Fearon E.R. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease, 6: 479-507
- Fearon E.R., Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61, 5: 759-767
- Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. 2013. GLOBOCAN 2012 v 1.0: Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, International Agency for Research on Cancer: baza podatkov
<http://globocan.iarc.fr> (junij, 2014)
- Fischer S.G., Lerman L.S. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80, 6: 1579-1583
- Fraher M.H., O'Toole P.W., Quigley E.M. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 9, 6: 312-322
- Frank D.N., St. Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 34: 13780-13785
- Grady W.M., Markowitz S.D. 2002. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 3: 101-128
- Green G.L., Brostoff J., Hudspith B., Michael M., Mylonaki M., Rayment N., Staines N., Sanderson J., Rampton D.S., Bruce K.D. 2006. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. Journal of Applied Microbiology, 100, 3: 460-469
- Hafner M. 2011. Črevesni divertikli. V: Interna medicina. 4. izd. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M. (ur.). Ljubljana, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo: 593-594
- Han Y.W., Shi W., Huang G.T., Kinder-Haake S., Park N.H., Kuramitsu H., Genco R.J. 2000. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. Infection and Immunity, 68, 6: 3140-3146

- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 5: 646-674
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 10: 986-994
- Hirayama A., Kami K., Sugimoto M., Sugawara M., Toki N., Onozuka H., Kinoshita T., Saito N., Ochiai A., Tomita M., Esumi H., Soga T. 2009. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research*, 69, 11: 4918-4925
- Hogan R. 2006. How to combine errors. Reading, University of Reading: 2 str. http://www.met.rdg.ac.uk/~swrhgnrj/combining_errors.pdf (junij 2014)
- Hooper L.V., Gordon J.I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, 5519: 1115-1118
- Humphries A., Wright N.A. 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8, 6: 415-424
- Huycke M.M., Gaskins H.R. 2004. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Experimental Biology and Medicine*, 229, 7: 586-597
- Iacopetta B. 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. *Human Mutation*, 21, 3: 271-276
- Jass J.R. 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50, 1: 113-130
- Kang H.Y., Kim N., Park Y.S., Hwang J.H., Kim J.W., Jeong S.H., Lee D.H., Jung H.C., Song I.S. 2006. Progression of atrophic gastritis and intestinal metaplasia drives *Helicobacter pylori* out of the gastric mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 51, 12: 2310-2315
- Kapatral V., Anderson I., Ivanova N., Reznik G., Los T., Lykidis A., Bhattacharyya A., Bartman A., Gardner W., Grechkin G., Zhu L., Vasieva O., Chu L., Kogan Y., Chaga O., Goltsman E., Bernal A., Larsen N., D'Souza M., Walunas T., Pusch G., Haselkorn R., Fonstein M., Kyripides N., Overbeek R. 2002. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *Journal of Bacteriology*, 184, 7: 2005-2018
- Keku T.O., McCoy A.N., Azcarate-Peril A.M. 2013. *Fusobacterium* spp. and colorectal cancer: cause or consequence? *Trends in Microbiology*, 21, 10: 506-508
- Kolenbrander P.E., Palmer R.J., Rickard A.H., Jakubovics N.S., Chalmers N.I., Diaz P.I. 2006. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology*, 42, 1: 47-79
- Kostic A.D., Chun E., Robertson L., Glickman J.N., Gallini C.A., Michaud M., Clancy T.E., Chung D.C., Lochhead P., Hold G.L., El-Omar E.M., Brenner D., Fuchs C.S., Meyerson M., Garrett W.S. 2013. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe*, 14, 2: 207-215
- Kostic A.D., Gevers D., Pedamallu C.S., Michaud M., Duke F., Earl A.M., Ojesina A.I., Jung J., Bass A.J., Tabernero J., Baselga J., Liu C., Shivdasani R., Ogino S., Birren B.W., Huttenhower C., Garrett W.S., Meyerson M. 2011. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22, 2: 292-298

- Lane D.J. 1991. 16s/23s rRNA sequencing, V: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.). West Sussex, John Wiley & Sons: 115-175
- Lawson P.A., Gharbia S.E., Shah H.N., Clark D.R. 1989. Recognition of *Fusobacterium nucleatum* subgroups Fn-1, Fn-2 and Fn-3 by ribosomal RNA gene restriction patterns. FEMS Microbiology Letters 53, 1-2: 41-46
- Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. Nature, 396, 6712: 643-649
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10, 3: 190-212
- Marchesi J.R., Dutilh B.E., Hall N., Peters W.H.M., Roelofs R., Boleij A., Tjalsma H. 2011. Towards the human colorectal cancer microbiome. PLoS ONE, 6, 5: e20447, doi:10.1371/journal.pone.0020447: 8 str.
- Marina M., Strong C.A., Civen R., Molitoris E., Finegold S.M. 1993. Bacteriology of anaerobic pleuropulmonary infections: preliminary report. Clinical Infectious Diseases, 16, 4: 256-262
- Markovič S. 2011a. Bolezni debelega črevesa. V: Interna medicina. 4. izd. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M. (ur.). Ljubljana, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo: 595-596
- Markovič S. 2011b. Polipi in polipoze. V: Interna medicina. 4. izd. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M. (ur.). Ljubljana, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo: 608-615
- McCoy A.N., Araújo-Pérez F., Azcárate-Peril A., Yeh J.J., Sandler R.S., Keku T.O. 2013. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. PLoS ONE, 8, 1: e53653, doi:10.1371/journal.pone.0053653: 8 str.
- McFarland L.V., Dublin S. 2008. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. World Journal of Gastroenterology, 14, 17: 2650-2661
- Mehlen P., Fearon E.R. 2004. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. Journal of Clinical Oncology, 22, 16: 3420-3428
- Momozawa Y., Deffontaine V., Louis E., Medrano, J.F. 2011. Characterization of bacteria in biopsies of colon and stools by high throughput sequencing of the V2 region of bacterial 16S rRNA gene in human. PLoS ONE, 6: e16952, doi: 10.1371/journal.pone.0016952: 10 str.
- Moore W.E.C., Holdeman L.V., Kelley W. 1984. Genus *Fusobacterium* (Knorr, 1922), V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Krieg N.R., Holt J.G. (eds.). Baltimore, Williams & Wilkins Company: 631-637
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 3: 695-700
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek, 73, 1: 127-141

- Novak-Mlakar D., Bračko M., Mežek G., Metličar T., Maučec-Zakotnik J. 2014. Letno poročilo o delovanju Programa Svit za obdobje od 1.1. do 31.12.2013. Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Center za upravljanje programov preventive in krepitve zdravja: 13 str.
<http://www.program-svit.si/sl/o-programu-svit/porocila> (junij, 2014)
- Osborn A.M., Moore E.R., Timmis K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39-50
- Palmer C., Bik E.M., Eisen M.B., Eckburg P.B., Sana T.R., Wolber P.K., Relman D.A., Brown P.O. 2006. Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Research*, 34, 1: e5, doi: 10.1093/nar/gnj007: 10 str.
- Parvathi A., Radhakrishnan S., Sajila M.P., Jacob B. 2011. Study of changes in bacterial and viral abundance in formaldehyde-fixed water samples by epifluorescence microscopy. *Environmental Monitoring and Assessment*, 177, 1-4: 227-231
- Phelps R.A., Broadbent T.J., Stafforini D.M., Jones D.A. 2009. New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 8, 16: 2549-2556
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.-M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., S. Ehrlich S.D., Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 7285: 59-65
- Rajilić-Stojanović M., Heilig H.G., Molenaar D., Kajander K., Surakka A., Smidt H., de Vos W.M. 2009. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*, 11, 7: 1736-1751
- Roberts G.L. 2000. Fusobacterial infections: an underestimated threat. *British Journal of Biomedical Science*, 57, 2: 156-162
- Rodriguez D., Bastida R., Olsson P.-E. 2002. DNA extraction from formalin-fixed franciscana tissues. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 1, 1: 123-128
- Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y.W. 2013. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host & Microbe*, 14, 2: 195-206
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 12: 5463-5467
- Sears C., Pardoll D. 2011. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *Journal of Infectious Diseases*, 203, 3: 1-6
- Shammas N.W., Murphy G.W., Eichelberger J., Klee D., Schwartz R., Bachman W. 1993. Infective endocarditis due to *Fusobacterium nucleatum*: case report and review of the literature. *Clinical Cardiology*, 16, 1: 72-75

- Sheng H., Shao J., Williams C.S., Pereira M.A., Taketo M.M., Oshima M., Reynolds A.B., Washington M.K., DuBois R.N., Beauchamp R.D. 1998. Nuclear translocation of β -catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis*, 19, 4: 543-549
- Sobhani I., Tap J., Roudot-Thoraval F., Roperch J.P., Letulle S., Langella P., Corthier G., Tran Van Nhieu J., Furet J.P. 2011. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS ONE*, 6, 1: e16393, doi:10.1371/journal.pone.0016393: 7 str.
- Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V., Theissig F., Rückert J.C., Ismail M., Rau W.A., Gaschler D., Weizenegger M., Kühn S., Schilling J., Dörffel W.V. 2011. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*, 60, 1: 34-40
- Štabuc B., Ferkolj I. 2011. Kolorektalni rak. V: Interna medicina. 4. izd. Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M. (ur.). Ljubljana, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo: 601-605
- Tahara T., Yamamoto E., Suzuki H., Maruyama R., Chung W., Garriga J., Jelinek J., Yamano H., Sugai T., An B., Shureiqi I., Toyota M., Kondo Y., Estécio M.R.H., Issa J.-P.J. 2014. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Research*, 74, 5: 1311-1318
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D.L., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11, 10: 2574-2584
- Tjalsma H., Boleij A., Marchesi J.R., Dutilh B.E. 2012. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 8: 575-582
- Toprak N.U., Yagci A., Gulluoglu B.M., Akin M.L., Demirkalem P., Celenk T., Soyletir G. 2006. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 8: 782-786
- Triantafillidis J.K., Nasioulas G., Kosmidis P.A. 2009. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Research*, 29, 7: 2727-2737
- Turnbaugh P.J., Gordon J.I. 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *Journal of Physiology*, 587, 17: 4153-4158
- Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. 2007. The human microbiome project. *Nature*, 449, 7164: 804-810
- Vachot A.M., Monerot M. 1996. Extraction, amplification and sequencing of DNA from formaldehyde-fixed specimens. *Ancient Biomolecules*, 1, 1: 3-16
- Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D. 2009. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55, 4: 641-658
- Vogelstein B., Kinzler K.W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genetics*, 9, 4: 138-141
- Walker A.W., Sanderson J.D., Churcher C., Parkes G.C., Hudspith B.N., Rayment N., Brostoff J., Parkhill J., Dougan G., Petrovska L. 2011. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiology* 11: 7, doi:10.1186/1471-2180-11-7: 12 str.

- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 297-303
- Wu A. H., Paganini-Hill A., Ross R. K., Henderson B. E. 1987. Alcohol, physical activity and other risk factors for colorectal cancer: a prospective study. *British Journal of Cancer*, 55, 6: 687-694
- Wu S., Rhee K.J., Zhang M., Franco A. Sears C.L. 2007. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. *Journal of Cell Science*, 120, 11: 1944-1952
- Zoetendal E.G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A.D., de Vos W.M. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 7: 3401-3407
- zur Hausen H. 2009. Human papillomavirus and cervical cancer. *Indian Journal of Medical Research*, 130: 209-209
- Žibret J. 2012. Verjetnost in statistika v tehniki in naravoslovju. 1. izd. Koper, Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije: 90-91

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za vložen čas in vso pomoč pri izvedbi magistrske naloge, kot tudi za vse nasvete in spodbude glede moje nadaljnje karierne poti.

Hvala prof. dr. Borutu Štabucu, dr. med. in Kliničnemu oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani za sodelovanje in pomoč pri študiji.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Andreji Nataši Kopitar za strokoven in hiter pregled magistrskega dela ter predsednici prof. dr. Darji Žgur Bertok za hiter odziv in sodelovanje.

Za vse nasvete in pomoč se zahvaljujem vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo Oddelka za zootehniko. Med njimi se posebej zahvaljujem dr. Luki Lipoglavšku, ki je z mano nesebično delil svoje znanje in me pri delu vedno znova usmeril na pravo pot.

Hvala vam »Rodičanke in Rodičani« Ana, Andreja, Brigit, Katja, Maša, Mojca, Urša, Duško in Luka za vso pomoč, prijateljstvo in za vse »pavze za kavo«.

Hvala tudi vsem ostalim prijateljem in prijateljicam.

Nadvse pa se iz srca zahvaljujem svoji družini za nesebično podporo in pomoč tekom študija.

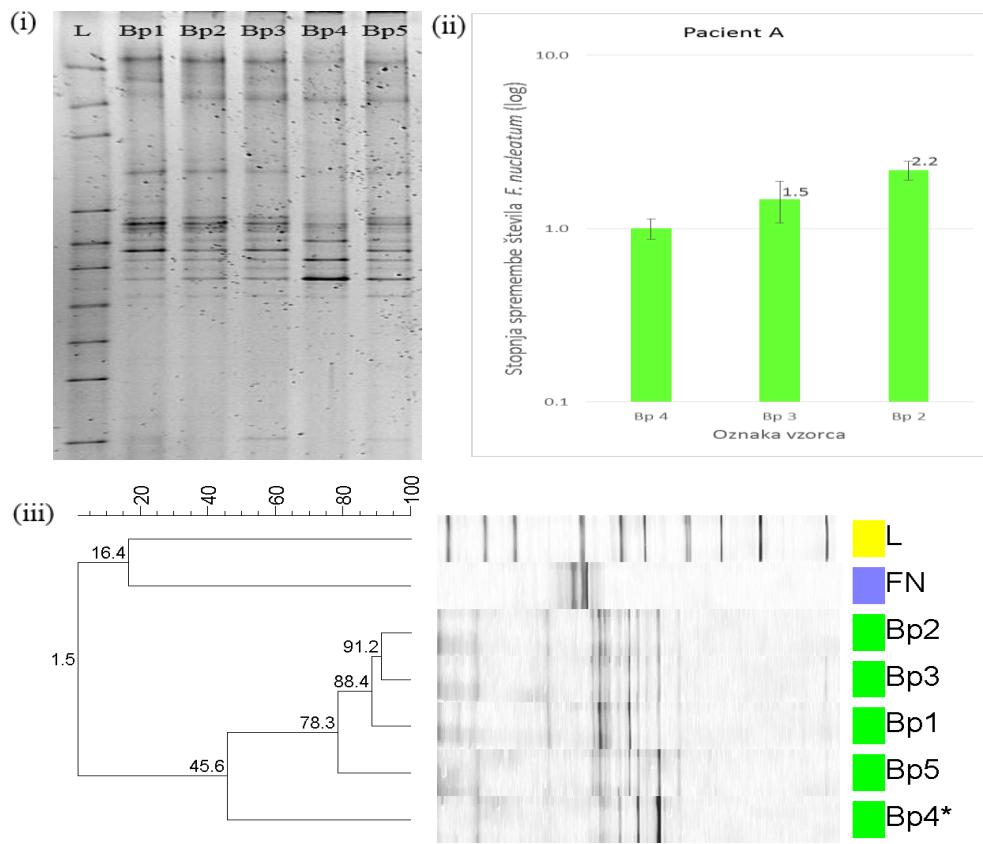
PRILOGE

Priloga A: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu A.

Priloga A1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu A.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
A/Bp 1	slepo črevo	bp	
A/Bp 2	desni zavoj debelega črevesa	bp	
A/Bp 3	prečni kolon	bp	benigno
A/Bp 4	esasto črevo	bp *	
A/Bp 5	danka	bp	

* divertikli: sindrom razdražljivega črevesa z obstipacijo

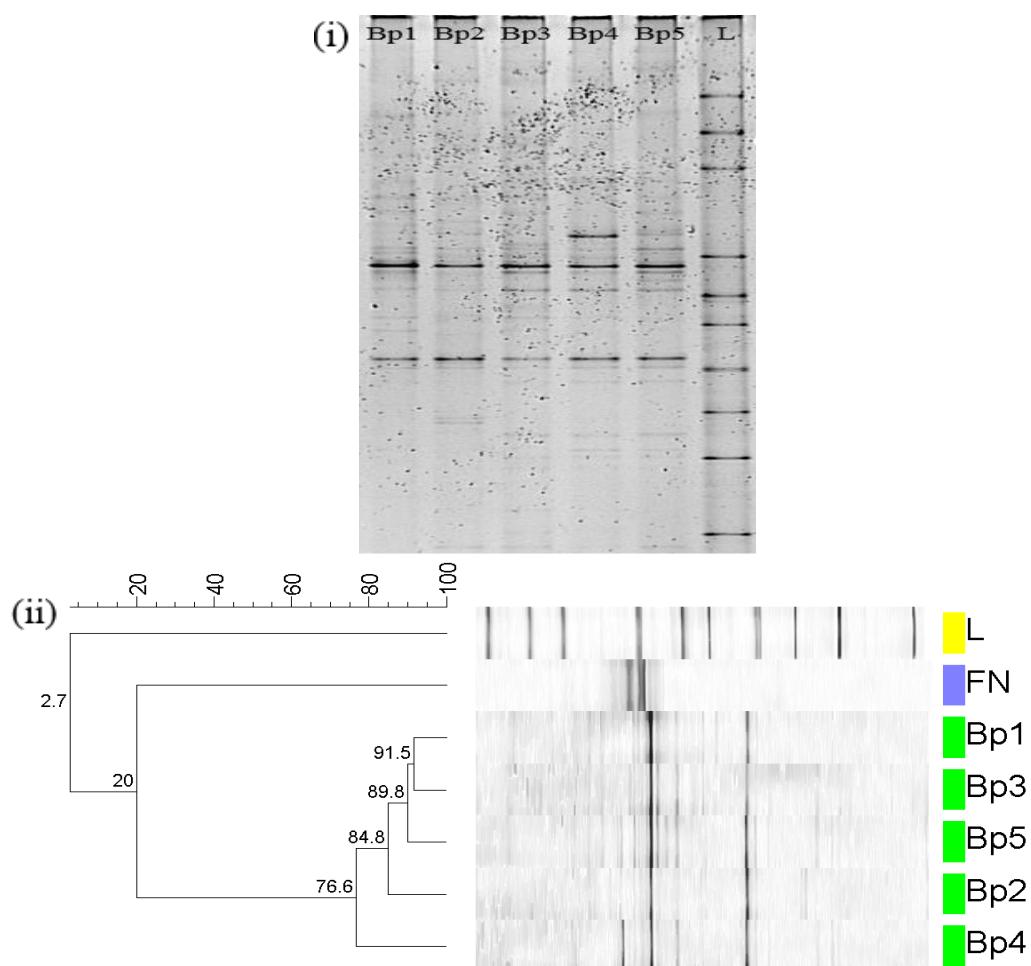


Priloga A2: Rezultati pri pacientu A: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga B: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu B.

Priloga B1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu B.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
B/Bp 1	slepo črevo	bp	
B/Bp 2	desni zavoj debelega črevesa	bp	
B/Bp 3	prečni kolon	bp	benigno
B/Bp 4	esasto črevo	bp	
B/Bp 5	danka	bp	

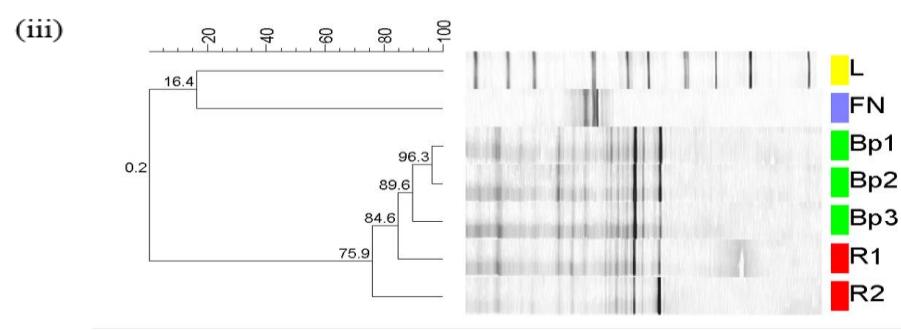
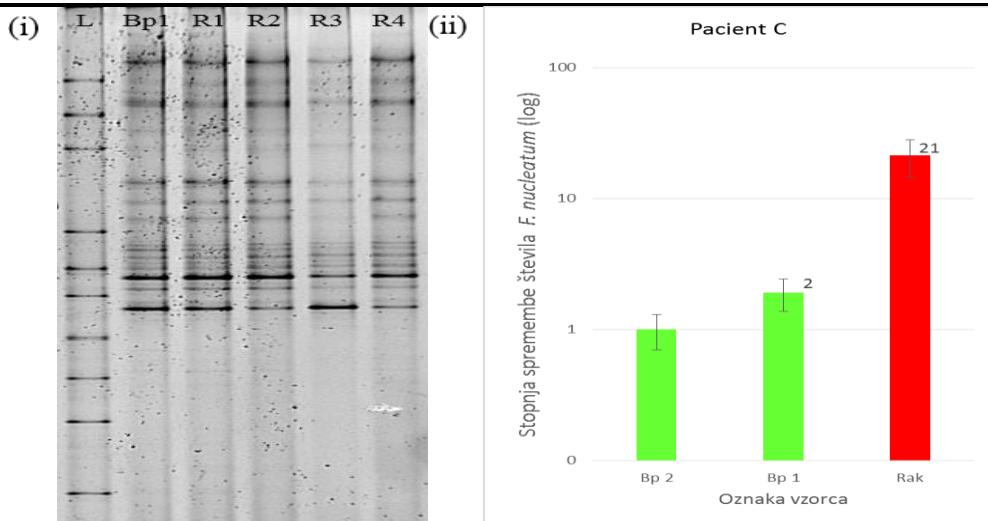


Priloga B2: Rezultati pri pacientu B: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga C: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu C.

Priloga C1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu C.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
C/Bp 1	slepo črevo	bp	benigno
C/Bp 2	navzgornji kolon	sesilna polipoidna neoplazma	
C/Bp 3	navzdolnji kolon	sesilna polipoidna neoplazma	benigno
C/R 1	danka	intermediarna polipoidna neoplazma	viložni adenom nizke stopnje
C/R 2	danka	intermediarna polipoidna neoplazma	displazije

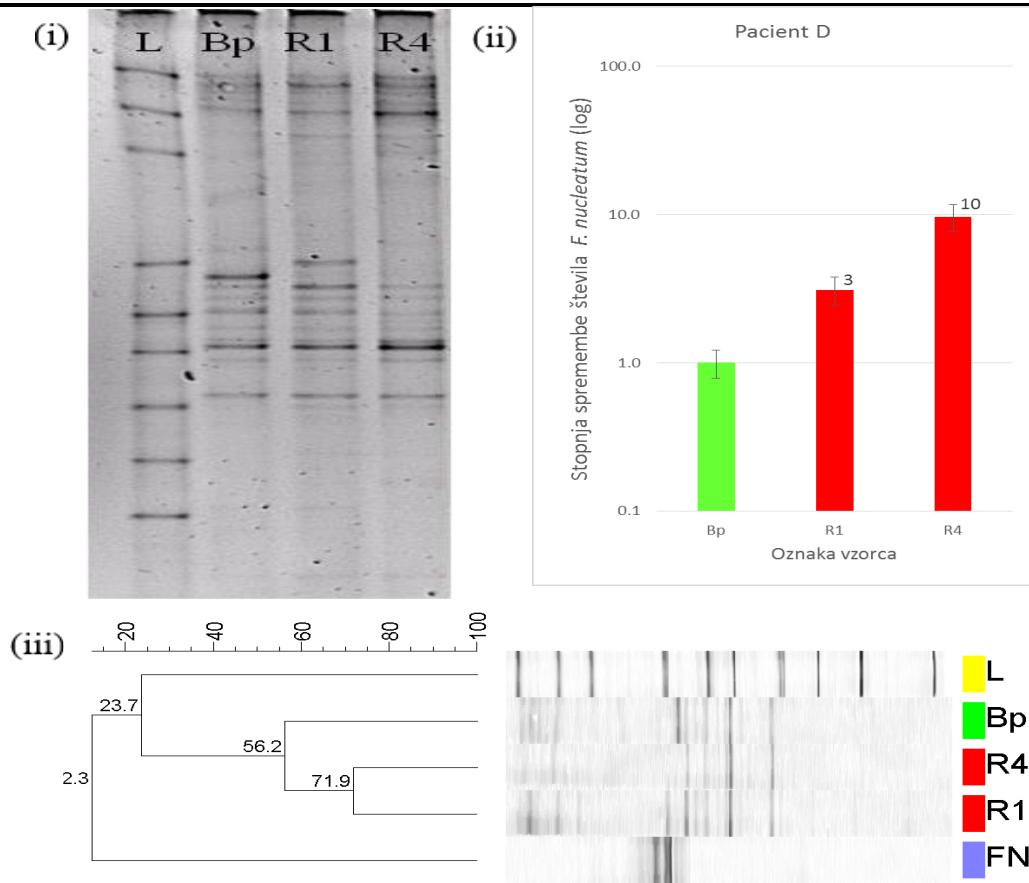


Priloga C2: Rezultati pri pacientu C: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga D: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu D.

Priloga D1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu D.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
D/Bp	slepo črevo	bp	benigno
D/R 1	esasto črevo	nepolipoidna neeksulceriarna neoplazma	adenom nizke stopnje
D/R 2	esasto črevo	nepolipoidna neeksulceriarna neoplazma	displazije
D/R 3	danka	pecljata polipoidna neoplazma	adenom nizke stopnje
D/R 4	danka	pecljata polipoidna neoplazma	displazije



Priloga D2: Rezultati pri pacientu D: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcev prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga E: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu E.

Priloga E1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu E.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
E/Bp 1	navzgornji kolon	bp	
E/Bp 2	navzgornji kolon	bp	benigno
E/Bp 2	navzgornji kolon	bp	
E/R	navzgornji kolon	polip	adenom nizke stopnje displazije

Priloga E2: Rezultati pri pacientu E: osamitev mikrobne DNK ni bila uspešna.

Priloga F: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu F.

Priloga F1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu F.

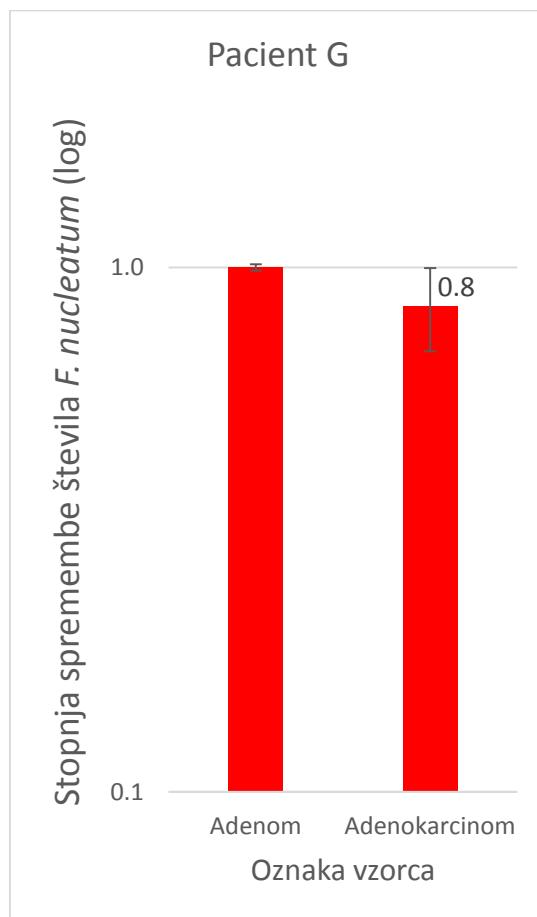
Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
F/Bp 1	navzgornji kolon	bp	
F/Bp 2	navzgornji kolon	bp	benigno
F/Bp 2	navzgornji kolon	bp	
F/F	navzgornji kolon	črevesna vsebina	/
F/R 1	navzgornji kolon	polip	adenom nizke stopnje
F/R 2	navzgornji kolon	polip	displazije

Priloga F2: Rezultati pri pacientu F: osamitev mikrobne DNK ni bila uspešna.

Priloga G: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu G.

Priloga G1: Mesto odvzema, opis in diagnoza vzorcev sluznice pacienta G.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
G/R 1	danka	polip	
G/R 2	danka	polip	adenom nizke stopnje displazije
G/R 3	danka	polip	
G/R 4	danka	tumor	
G/R 5	danka	tumor	adenokarcinom
G/R 6	danka	tumor	

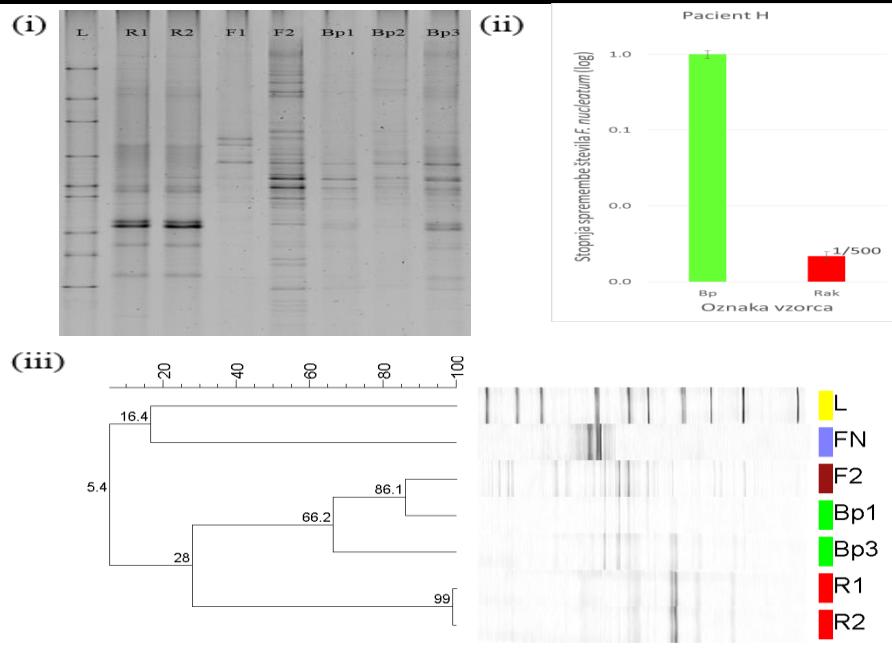


Priloga G2: Rezultati pri pacientu G: stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih adenoma in adenokarcinoma, ki so bili odvzeti v istem delu prebavnega trakta na razdalji 10 cm, podatki so prikazani na logaritemski skali in so normalizirani glede na vzorec adenoma, vrednosti na vrhu stolpcev prikazujejo stopnjo spremembe.

Priloga H: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu H.

Priloga H1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu H.

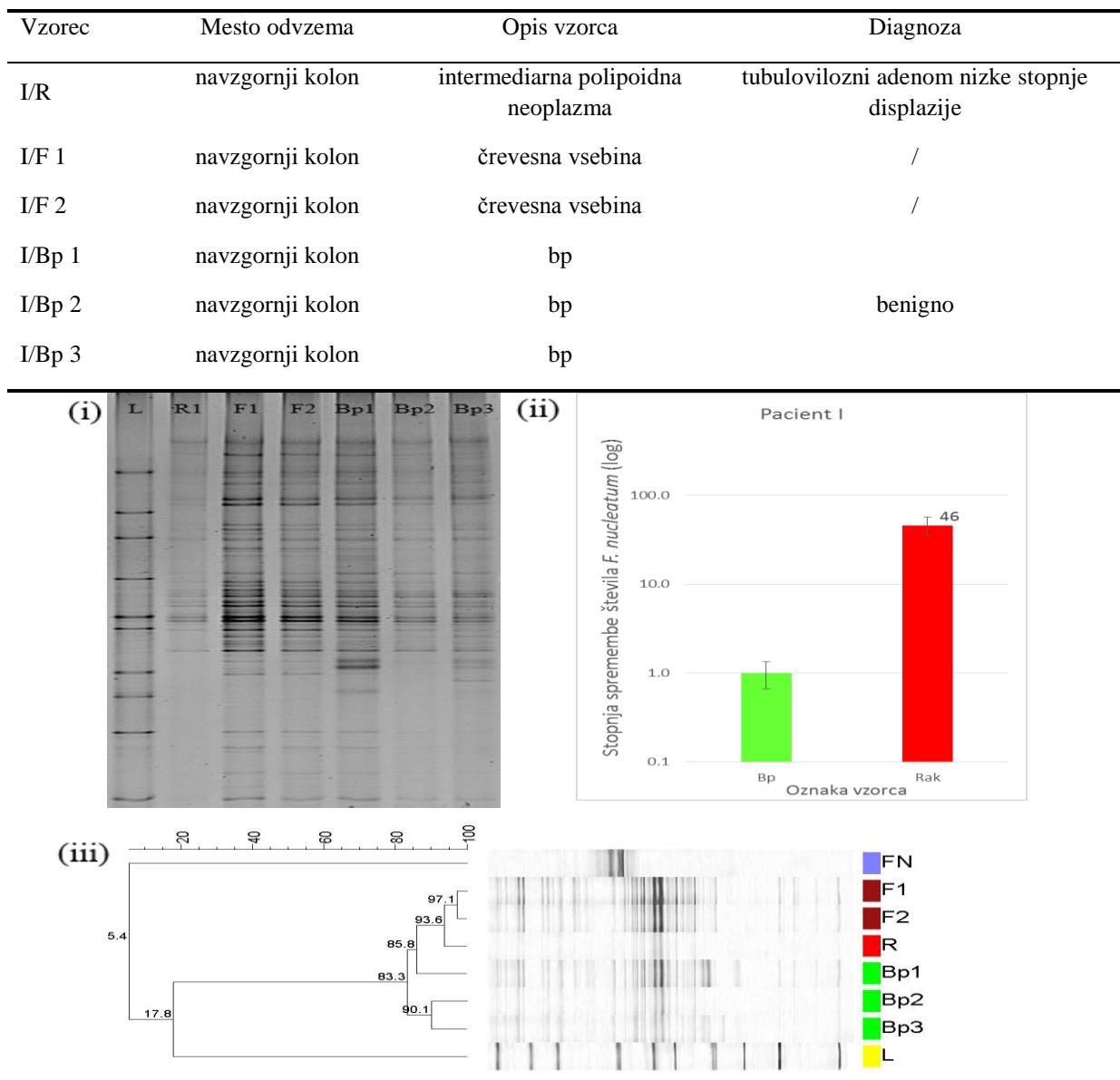
Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
H/R 1	prečni kolon	intermediarna polipoidna neoplazma	tubularni adenom
H/R 2	prečni kolon	intermediarna polipoidna neoplazma	nizke stopnje displazije
H/F 1	prečni kolon	črevesna vsebina	/
H/F 2	prečni kolon	črevesna vsebina	/
H/Bp 1	prečni kolon	bp	
H/Bp 2	prečni kolon	bp	
H/Bp 3	prečni kolon	bp	benigno
H/Bp 4	prečni kolon	bp	



Priloga H2: Rezultati pri pacientu H: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti. Zaradi šibkega signala in posledično neinformativnega DGGE profila smo iz analize izključili vzorca F1 in Bp2.

Priloga I: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu I.

Priloga II: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu I.

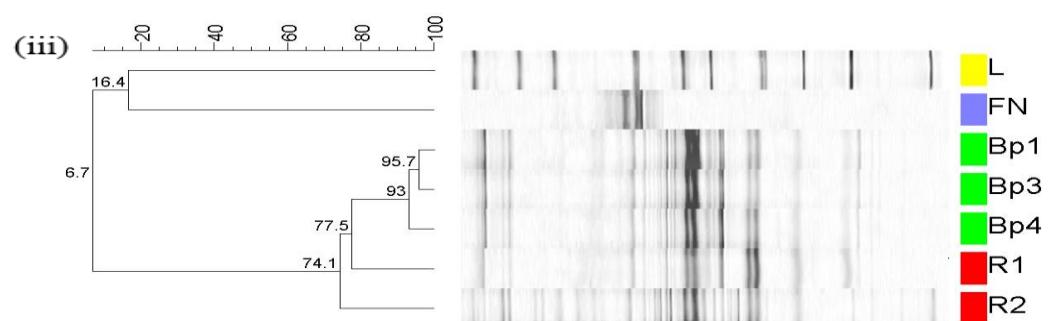
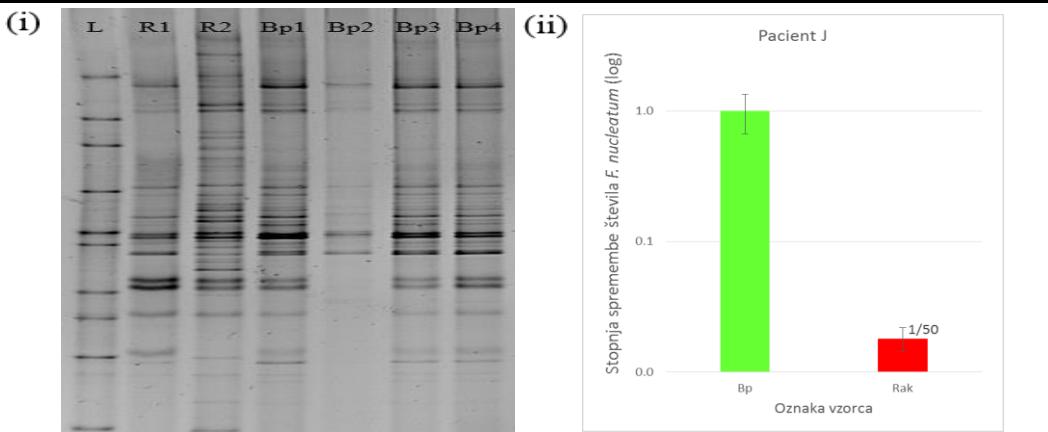


Priloga I2: Rezultati pri pacientu I: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga J: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu J.

Priloga J1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu J.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
J/R 1	esasto črevo	pecljata polipoidna neoplazma	tubularni adenom nizke stopnje displazije
J/R 2	esasto črevo	pecljata polipoidna neoplazma	
J/Bp 1	esasto črevo	bp	
J/Bp 2	esasto črevo	bp	
J/Bp 3	esasto črevo	bp	benigno
J/Bp 4	esasto črevo	bp	

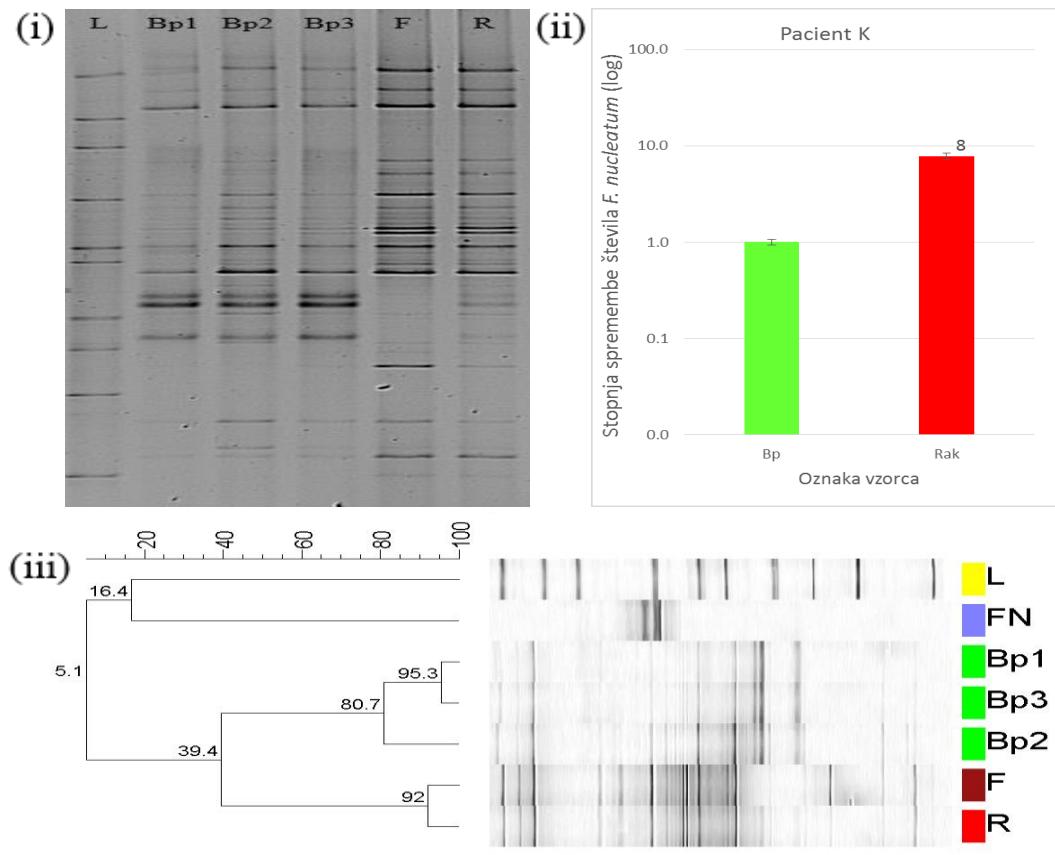


Priloga J2: Rezultati pri pacientu J: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti. Zaradi šibkega signala in posledično neinformativnega DGGE profila smo iz analize izključili vzorec Bp2.

Priloga K: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu K.

Priloga K1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu K.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
K/Bp 1	navzdoljni kolon	bp	
K/Bp 2	navzdoljni kolon	bp	benigno
K/Bp 3	navzdoljni kolon	bp	
K/F	navzdoljni kolon	črevesna vsebina	/
K/R	navzdoljni kolon	polip sigme	adenom nizke stopnje displazije

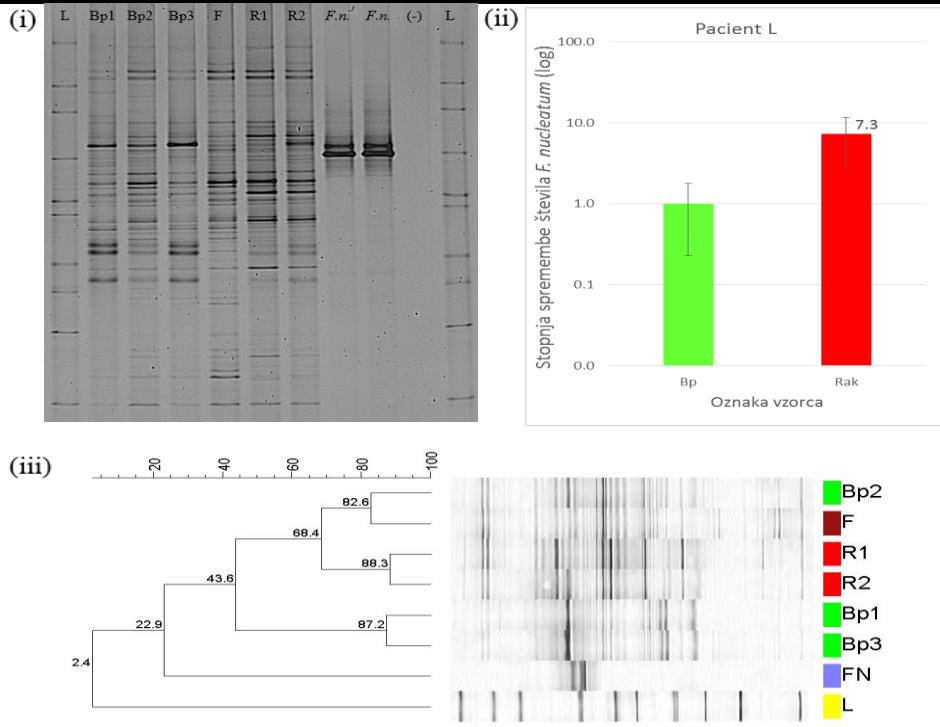


Priloga K2: Rezultati pri pacientu K: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcev prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga L: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu L.

Priloga L1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu L.

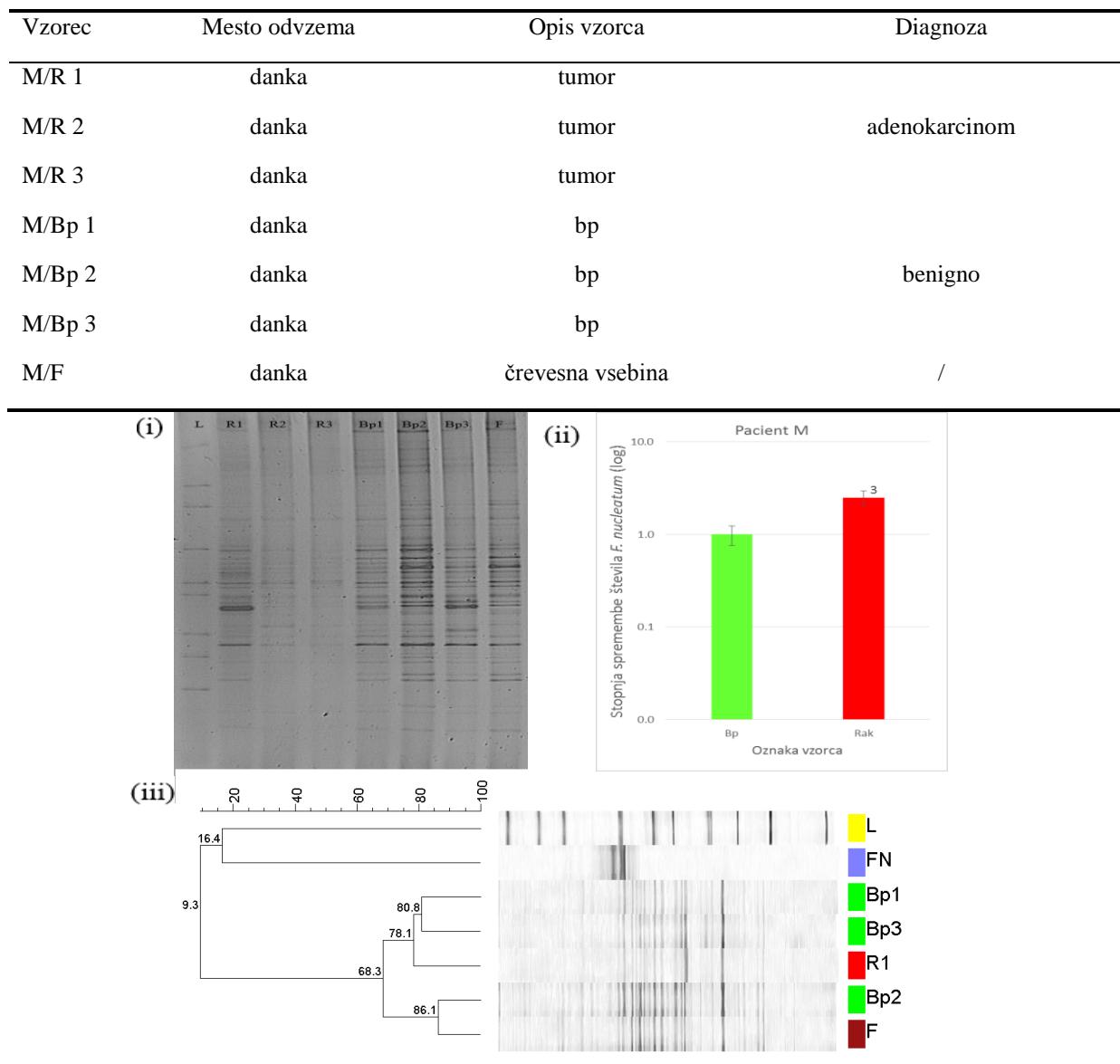
Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
L/Bp 1	slepo črevo	bp	
L/Bp 2	slepo črevo	bp	benigno
L/Bp 3	slepo črevo	bp	
L/F	slepo črevo	črevesna vsebina	/
L/R 1	slepo črevo	malignom	
L/R 2	slepo črevo	malignom	adenokarcinom



Priloga L2: Rezultati pri pacientu L: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica, »F.n.« čista kultura *F. nucleatum*, »(-)« negativna kontrola), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcev prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga M: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu M.

Priloga M1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu M.

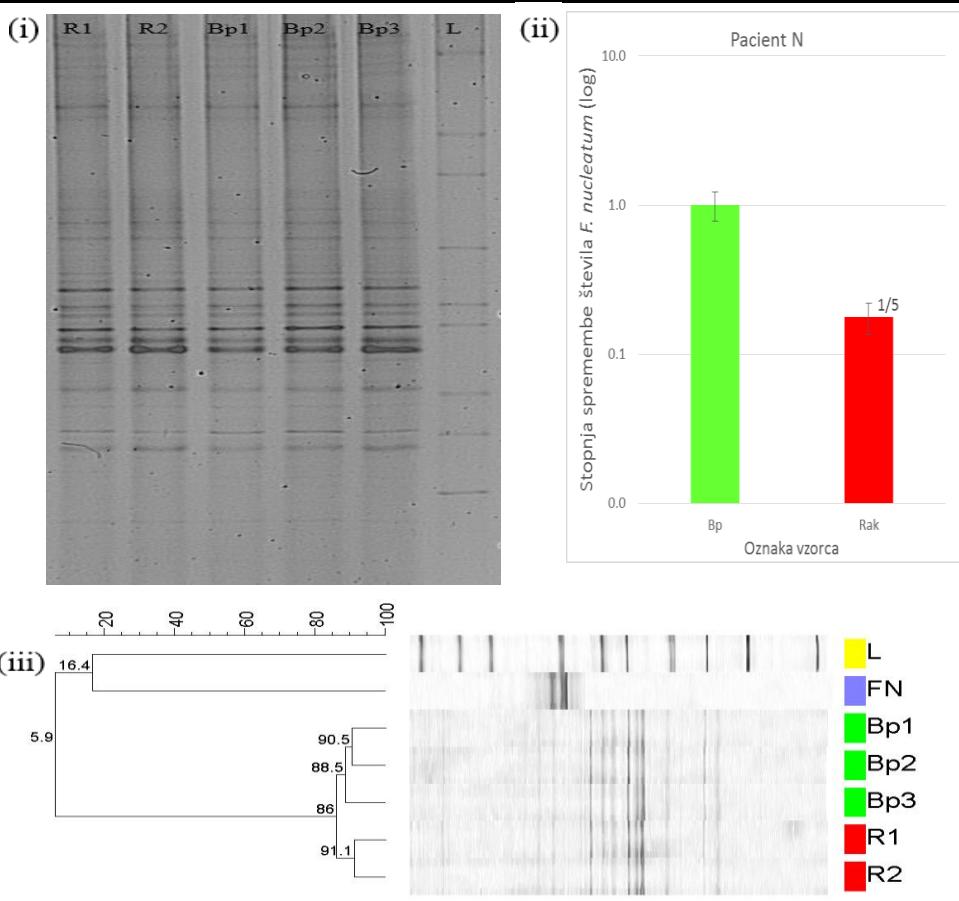


Priloga M2: Rezultati pri pacientu M: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti. Zaradi šibkega signala in posledično neinformativnega DGGE profila smo iz analize izključili vzorca R2 in R3.

Priloga N: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu N.

Priloga N1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu N.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
N/R 1	navzgornji kolon	tumor	
N/R 2	navzgornji kolon	tumor	adenokarcinom
N/Bp 1	navzgornji kolon	bp	
N/Bp 2	navzgornji kolon	bp	benigno
N/Bp 3	navzgornji kolon	bp	

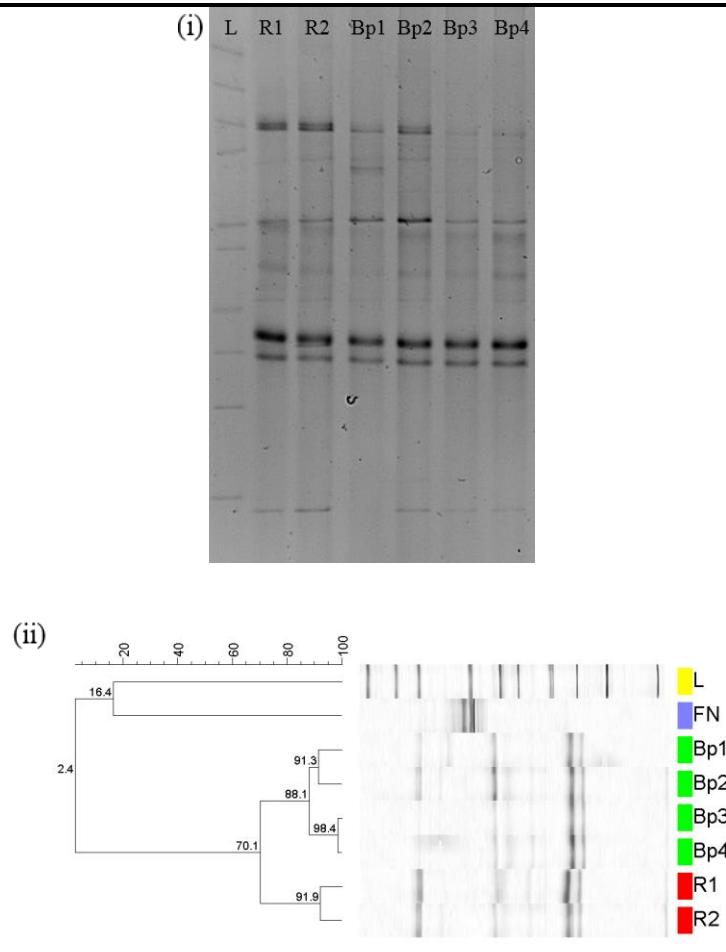


Priloga N2: Rezultati pri pacientu N: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga O: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu O.

Priloga O1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice ter diagnoza pri pacientu O.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
O/R 1	esasto črevo	polip	adenom nizke stopnje displazije
O/R 2	prečni kolon	tumor linealne fleksure	adenokarcinom
O/Bp 1	prečni kolon	bp	
O/Bp 2	prečni kolon	bp	benigno
O/Bp 3	prečni kolon	bp	
O/Bp 4	prečni kolon	bp	

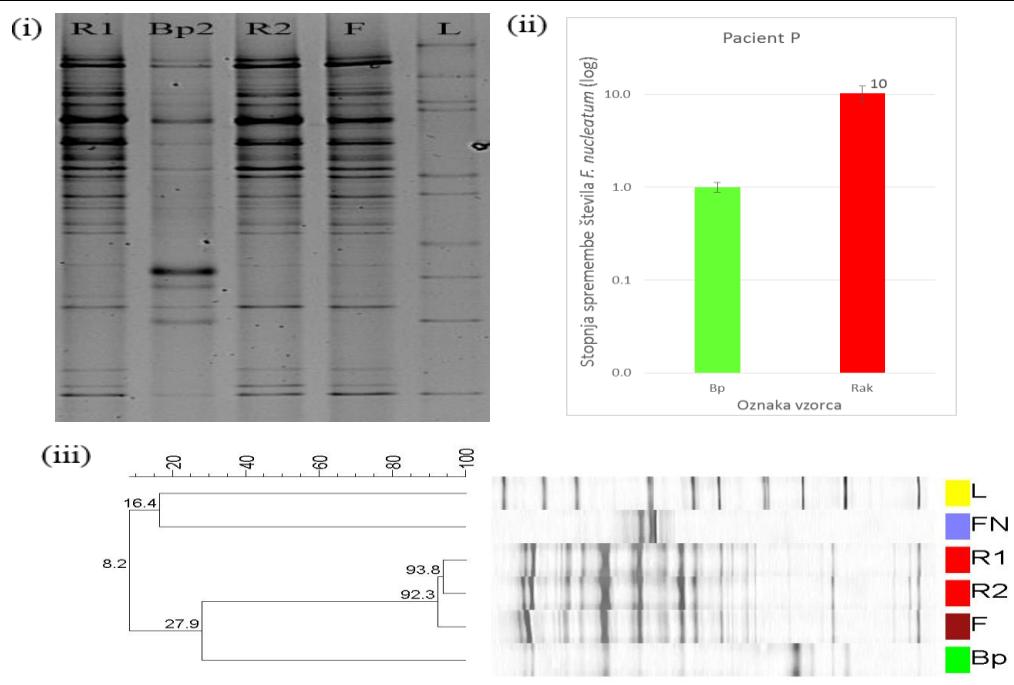


Priloga O2: Rezultati pri pacientu O: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice (»L« lestvica), (ii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga P: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu P.

Priloga P1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu P.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
P/Bp 1	prehod med danko in esastim črevesom	bp	
P/Bp 2	prehod med danko in esastim črevesom	bp	benigno
P/R 1	prehod med danko in esastim črevesom	malignom	
P/R 2	prehod med danko in esastim črevesom	malignom	adenokarcinom
P/F	prehod med danko in esastim črevesom	črevesna vsebina	/

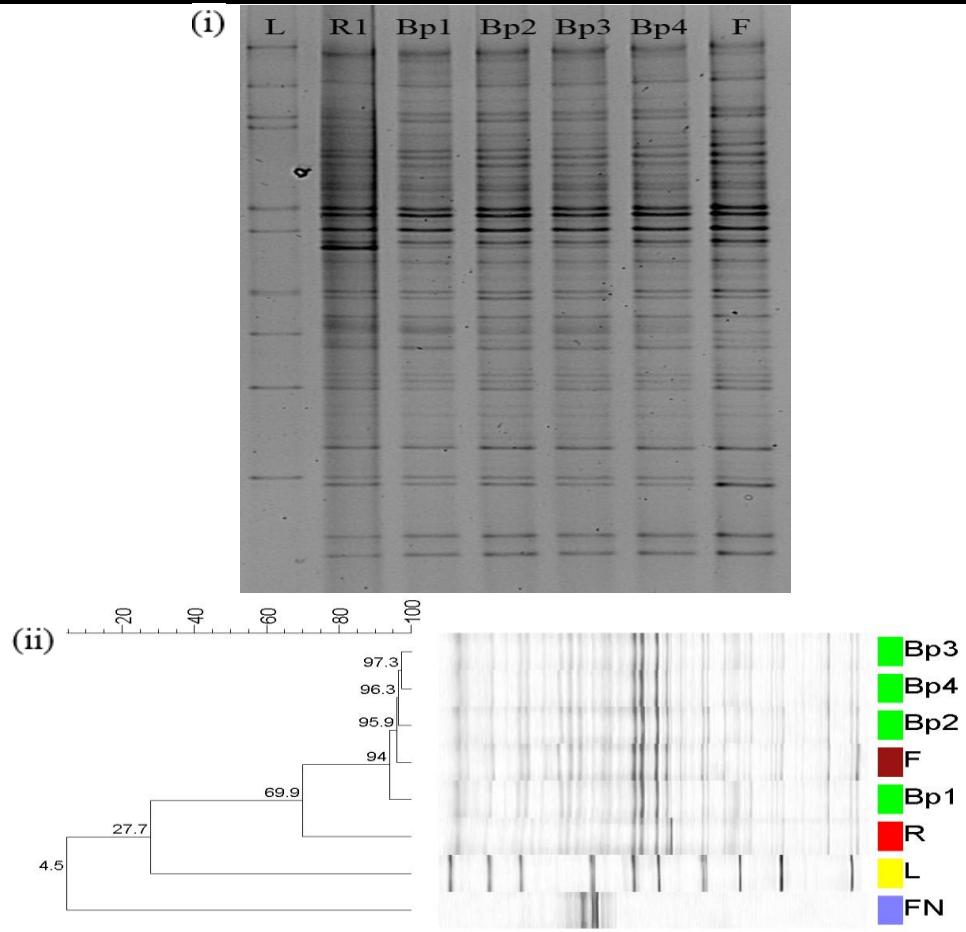


Priloga P2: Rezultati pri pacientu P: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga Q: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu R.

Priloga Q1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu R.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
R/R	esasto črevo	polip	tubolovilozni adenom visoke stopnje displazije
R/Bp 1	esasto črevo	bp	
R/Bp 2	esasto črevo	bp	
R/Bp 3	esasto črevo	bp	benigno
R/Bp 4	esasto črevo	bp	
R/F	esasto črevo	črevesna vsebina	/

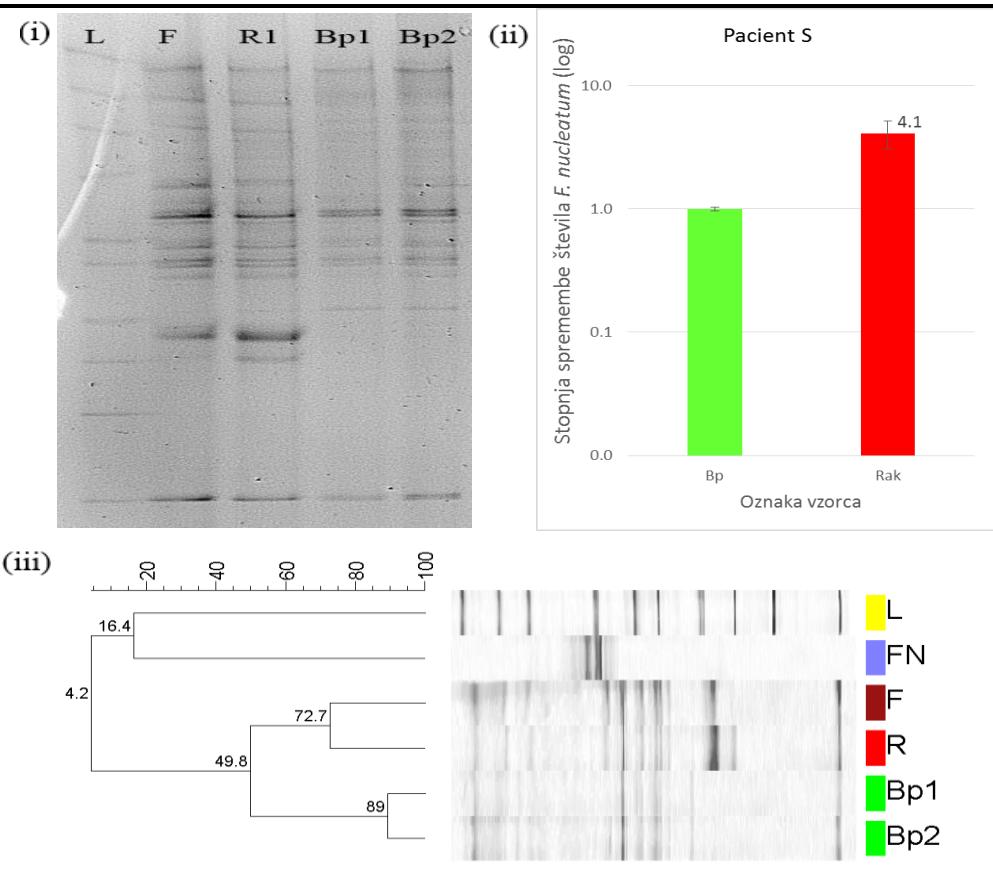


Priloga Q2: Rezultati pri pacientu R: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), in (ii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga R: Opis vzorcev in rezultati pri pacientu S.

Priloga R1: Mesto odvzema in opis vzorcev črevesne sluznice oziroma črevesne vsebine ter diagnoza pri pacientu S.

Vzorec	Mesto odvzema	Opis vzorca	Diagnoza
S/F	esasto črevo	črevesna vsebina	/
S/R	esasto črevo	polip	adenom nizke stopnje displazije
S/Bp1	esasto črevo	bp	benigno
S/Bp2	esasto črevo	bp	



Priloga R2: Rezultati pri pacientu S: (i) DGGE profili iz pomnožkov genov za 16S rRNK vseh bakterij v vzorcih črevesne sluznice in črevesne vsebine (»L« lestvica), (ii) stopnja spremembe števila bakterij iz rodu *Fusobacterium* v vzorcih nespremenjene in tumorsko spremenjene črevesne sluznice, podatki so normalizirani glede na vzorec z najnižjo vrednostjo ter prikazani na logaritemski skali, vrednosti na vrhu stolpcov prikazujejo stopnjo spremembe, (iii) dendrogram, na katerem je razvidno združevanje posameznih vzorcev glede na podobnost DGGE profilov (»L« lestvica, »FN« čista kultura *F. nucleatum*, »Bp« vzorec brez spremembe, »R« tumorsko spremenjen vzorec, »F« črevesna vsebina), vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Priloga S: Izračuni sprememb v številu fuzobakterijskih tarč v tumorsko spremenjeni sluznici glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa ozziroma danke preiskovanih pacientov.

Pacient (primerjani vzorci)	Nespremenjena sluznica (Bp)		Nespremenjena sluznica (Bp)		
	Povprečje	Standardni odklon	Povprečje	Standardni odklon	Diagona
A (Bp4 : Bp3)	1,4E-03	1,3E-04	2,1E-03	5,2E-04	bp
A (Bp4 : Bp2)	1,4E-03	1,3E-04	3,0E-03	2,3E-04	bp
C (Bp2 : Bp1)	3,6E-04	7,8E-05	6,9E-04	1,2E-04	bp
Tumorsko spremenjena sluznica (Rak)					
	Stopnja spremembe	Standardni odklon		Standardni odklon	Diagona
C (Bp2 : Rak)	3,6E-04	7,8E-05	1,8E-03	1,8E-03	adenom
D *(Bp : Rak1)	5,4E-05	8,3E-06	1,7E-04	2,5E-05	adenom
D *(Bp : Rak4)	5,4E-05	8,3E-06	5,3E-04	7,3E-05	adenom
G** (Rak1 : Rak4)	9,5E-04	9,2E-06	8,0E-04	1,4E-04	adenokarcinom
H (Bp : Rak)	2,3E-03	2,1E-04	5,1E-06	5,8E-07	adenom
I (Bp : Rak)	9,3E-05	2,2E-05	4,3E-03	2,5E-04	adenom
J (Bp : Rak)	1,0E-03	2,4E-04	1,8E-05	2,3E-07	adenom
K (Bp : Rak)	2,4E-05	1,2E-06	1,9E-04	1,1E-05	adenom
L (Bp : Rak)	1,1E-01	6,0E-02	8,0E-01	2,0E-01	adenokarcinom
M (Bp : Rak)	1,8E-01	3,1E-02	4,5E-01	1,8E-02	adenokarcinom
N (Bp : Rak)	1,8E-03	2,9E-04	3,3E-04	5,9E-05	adenokarcinom
P (Bp : Rak)	9,0E-04	2,9E-04	9,3E-03	1,6E-03	adenokarcinom
S (Bp : Rak)	4,0E-03	1,0E-04	1,6E-02	4,2E-03	adenom

* Pacient D: pri tem pacientu sta bila odvzeta dva vzorca tumorsko spremenjene sluznice iz različnih predelov črevesa.

** Pacient G: pri tem pacientu ni bil odvzet vzorec nespremenjene sluznice, zato smo primerjavo opravili med vzorcem R1 (adenom) in vzorcem R4 (adenokarcinom).

Priloga T: Izpis programa ViiA 7.0 za qPCR SYBR Green z bakterijskimi univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi za ugotavljanje števila vseh bakterijskih tarč v vzorcih.

Block Type	384-Well Block						Target Name	16S rRNK		
Chemistry	SYBR_GREEN									
Experiment Barcode										
Experiment Comments										
Experiment Name	2014-01-27 114253									
Experiment Run End Time	2014-01-28 19:20:20 PM CET									
Experiment Type	Standard									
Experiment User Name										
Instrument Type	ViiA 7									
Passive Reference	ROX									
Quantification Cycle Method	Ct									
Signal Smoothing On	false									
Stage/ Cycle where Analysis is performed	Stage 2, Step 2									
Omit	Sample Name	Task	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Ct Threshold	Tm1
FALSE	G R4	UNKN	17,27	17,275	0,006	58.505,43	58.691,40	262,99	0,302	82,889
FALSE	G R4	UNKN	17,27	17,275	0,006	58.877,36	58.691,40	262,99	0,302	83,024
FALSE	P Bp2	UNKN	16,22	16,192	0,051	121.563,91	124.679,45	4.406,04	0,302	83,024
FALSE	P Bp2	UNKN	16,15	16,192	0,051	127.794,99	124.679,45	4.406,04	0,302	83,024
FALSE	Std2	STAN	13,95	13,975	0,031	580.000,00			0,302	81,949
FALSE	Std2	STAN	13,99	13,975	0,031	580.000,00			0,302	81,949
FALSE	A Bp2	UNKN	17,03	17,035	0,006	69.151,94	69.349,35	279,19	0,302	82,889
FALSE	A Bp2	UNKN	17,03	17,035	0,006	69.546,77	69.349,35	279,19	0,302	83,024
FALSE	H R1	UNKN	14,87	14,868	0,014	310.990,75	313.128,44	3.023,17	0,302	82,889
FALSE	H R1	UNKN	14,85	14,868	0,014	315.266,16	313.128,44	3.023,17	0,302	83,024
FALSE	K R	UNKN	17,28	17,233	0,076	58.210,59	60.476,54	3.204,54	0,302	82,889
FALSE	K R	UNKN	17,17	17,233	0,076	62.742,49	60.476,54	3.204,54	0,302	83,024
FALSE	P R1	UNKN	14,58	14,731	0,200	380.293,38	346.287,44	48.091,64	0,302	83,158
FALSE	P R1	UNKN	14,87	14,731	0,200	312.281,53	346.287,44	48.091,64	0,302	83,024
FALSE	Std3	STAN	16,27	16,259	0,016	116.000,00			0,302	81,949
FALSE	Std3	STAN	16,24	16,259	0,016	116.000,00			0,302	81,949
FALSE	A Bp3	UNKN	18,05	18,020	0,055	34.007,16	34.944,61	1.325,75	0,302	82,889
FALSE	A Bp3	UNKN	17,98	18,020	0,055	35.882,05	34.944,61	1.325,75	0,302	83,024
FALSE	L Bp2	UNKN	16,38	16,389	0,010	109.175,37	108.662,06	725,92	0,302	83,024
FALSE	L Bp2	UNKN	16,39	16,389	0,010	108.148,77	108.662,06	725,92	0,302	83,024
FALSE	Std4	STAN	18,69	18,672	0,028	23.200,00			0,302	81,949
FALSE	Std4	STAN	18,65	18,672	0,028	23.200,00			0,302	81,949
FALSE	A Bp4	UNKN	20,38	20,341	0,064	6.731,30	6.951,49	311,39	0,302	82,889
FALSE	A Bp4	UNKN	20,29	20,341	0,064	7.171,67	6.951,49	311,39	0,302	82,889
FALSE	L Bp3	UNKN	16,01	16,066	0,077	141.374,41	136.203,77	7.312,39	0,302	83,024
FALSE	L Bp3	UNKN	16,12	16,066	0,077	131.033,13	136.203,77	7.312,39	0,302	83,024
FALSE	R R	UNKN	14,40	14,457	0,071	431.748,00	417.210,31	20.559,39	0,302	83,024
FALSE	R R	UNKN	14,50	14,457	0,071	402.672,63	417.210,31	20.559,39	0,302	83,024
FALSE	Std5	STAN	20,98	20,932	0,068	4.640,00			0,302	81,949
FALSE	Std5	STAN	20,88	20,932	0,068	4.640,00			0,302	81,949
FALSE	B Bp3	UNKN	16,46	16,461	0,010	102.821,14	103.343,88	739,27	0,302	83,024
FALSE	B Bp3	UNKN	16,45	16,461	0,010	103.866,63	103.343,88	739,27	0,302	82,889
FALSE	H Bp4	UNKN	17,91	17,943	0,039	37.581,22	36.874,63	999,27	0,302	83,024
FALSE	H Bp4	UNKN	17,97	17,943	0,039	36.168,04	36.874,63	999,27	0,302	83,024
FALSE	Std6	STAN	23,19	23,204	0,019	928,00			0,302	81,949
FALSE	Std6	STAN	23,21	23,204	0,019	928,00			0,302	81,949
FALSE	B Bp4	UNKN	17,73	17,740	0,012	42.721,18	42.467,65	358,55	0,302	83,024
FALSE	B Bp4	UNKN	17,74	17,740	0,012	42.214,12	42.467,65	358,55	0,302	83,024
FALSE	I R1	UNKN	22,72	22,679	0,070	1.319,58	1.366,90	66,92	0,302	83,024
FALSE	I R1	UNKN	22,62	22,679	0,070	1.414,22	1.366,90	66,92	0,302	83,024
FALSE	L R1	UNKN	15,42	15,401	0,028	213.122,88	216.130,91	4.253,99	0,302	83,024
FALSE	L R1	UNKN	15,38	15,401	0,028	219.138,92	216.130,91	4.253,99	0,302	83,024
FALSE	R Bp2	UNKN	16,23	16,223	0,023	120.664,29	122.016,02	1.911,64	0,302	83,024
FALSE	R Bp2	UNKN	16,20	16,223	0,023	123.367,76	122.016,02	1.911,64	0,302	83,024

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge T«

Omit	Sample Name	Task	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Ct Threshol	Tm1
FALSE	B Bp5	UNKN	17,308	17,323	0,021	57.343,47	56.754,79	832,52	0,302	83,024
FALSE	B Bp5	UNKN	17,338	17,323	0,021	56.166,10	56.754,79	832,52	0,302	83,024
FALSE	M R1	UNKN	21,704	21,699	0,007	2.691,31	2.700,67	13,23	0,302	83,024
FALSE	M R1	UNKN	21,694	21,699	0,007	2.710,03	2.700,67	13,23	0,302	83,024
FALSE	C Bp1	UNKN	15,919	15,926	0,011	150.745,13	149.947,50	1.128,01	0,302	83,024
FALSE	C Bp1	UNKN	15,934	15,926	0,011	149.149,88	149.947,50	1.128,01	0,302	83,024
FALSE	I Bp1	UNKN	17,289	17,255	0,047	58.123,59	59.513,05	1.964,99	0,302	83,024
FALSE	I Bp1	UNKN	17,221	17,255	0,047	60.902,50	59.513,05	1.964,99	0,302	83,024
FALSE	M Bp1	UNKN	18,998	18,961	0,052	17.693,90	18.159,91	659,04	0,302	83,024
FALSE	M Bp1	UNKN	18,924	18,961	0,052	18.625,93	18.159,91	659,04	0,302	83,024
FALSE		NTC	26,221						0,302	80,875
FALSE		NTC	26,269						0,302	80,875
FALSE	C Bp2	UNKN	16,246	16,262	0,022	120.021,30	118.723,14	1.835,88	0,302	83,024
FALSE	C Bp2	UNKN	16,278	16,262	0,022	117.424,98	118.723,14	1.835,88	0,302	83,024
FALSE	I Bp2	UNKN	21,133	21,149	0,022	4.004,62	3.961,33	61,23	0,302	83,024
FALSE	I Bp2	UNKN	21,165	21,149	0,022	3.918,03	3.961,33	61,23	0,302	83,426
FALSE	M Bp2	UNKN	15,094	15,103	0,013	267.670,38	265.908,16	2.492,15	0,302	83,024
FALSE	M Bp2	UNKN	15,113	15,103	0,013	264.145,94	265.908,16	2.492,15	0,302	83,024
FALSE	S R	UNKN	16,543	16,686	0,203	97.656,38	88.810,55	12.509,89	0,302	83,158
FALSE	S R	UNKN	16,830	16,686	0,203	79.964,73	88.810,55	12.509,89	0,302	83,024
FALSE		NTC	26,302						0,302	81,009
FALSE		NTC	26,252						0,302	80,741
FALSE	C R2	UNKN	19,549	19,565	0,022	12.058,67	11.927,54	185,45	0,302	83,024
FALSE	C R2	UNKN	19,581	19,565	0,022	11.796,41	11.927,54	185,45	0,302	83,024
FALSE		NTC	26,295						0,302	80,741
FALSE		NTC	26,094						0,302	80,741
FALSE	D Bp	UNKN	16,154	16,117	0,052	127.987,46	131.366,36	4.778,48	0,302	82,889
FALSE	D Bp	UNKN	16,080	16,117	0,052	134.745,25	131.366,36	4.778,48	0,302	83,024
FALSE	J R2	UNKN	16,711	16,698	0,018	86.868,94	87.649,61	1.104,03	0,302	83,024
FALSE	J R2	UNKN	16,685	16,698	0,018	88.430,27	87.649,61	1.104,03	0,302	83,024
FALSE	N R2	UNKN	15,993	15,949	0,062	143.117,66	147.647,38	6.405,99	0,302	83,024
FALSE	N R2	UNKN	15,905	15,949	0,062	152.177,09	147.647,38	6.405,99	0,302	83,024
FALSE	S Bp2	UNKN	23,327	23,302	0,035	870,39	885,49	21,35	0,302	83,024
FALSE	S Bp2	UNKN	23,278	23,302	0,035	900,59	885,49	21,35	0,302	83,024
FALSE	D R1	UNKN	17,910	17,895	0,021	37.722,28	38.116,60	557,66	0,302	82,889
FALSE	D R1	UNKN	17,880	17,895	0,021	38.510,93	38.116,60	557,66	0,302	82,889
FALSE	J Bp1	UNKN	16,154	16,120	0,048	127.999,52	131.071,22	4.344,03	0,302	82,889
FALSE	J Bp1	UNKN	16,087	16,120	0,048	134.142,91	131.071,22	4.344,03	0,302	83,024
FALSE	N Bp1	UNKN	16,547	16,471	0,108	97.349,97	102.789,28	7.692,35	0,302	83,024
FALSE	N Bp1	UNKN	16,395	16,471	0,108	108.228,59	102.789,28	7.692,35	0,302	83,024
FALSE	D R4	UNKN	19,680	19,705	0,035	11.009,61	10.821,16	266,51	0,302	82,889
FALSE	D R4	UNKN	19,730	19,705	0,035	10.632,70	10.821,16	266,51	0,302	82,889
FALSE	J Bp3	UNKN	16,755	16,775	0,028	84.245,02	83.119,11	1.592,28	0,302	83,024
FALSE	J Bp3	UNKN	16,794	16,775	0,028	81.993,20	83.119,11	1.592,28	0,302	83,024
FALSE	N Bp2	UNKN	16,427	16,448	0,030	105.871,91	104.339,16	2.167,64	0,302	83,024
FALSE	N Bp2	UNKN	16,469	16,448	0,030	102.806,41	104.339,16	2.167,64	0,302	83,024
FALSE	J Bp4	UNKN	16,142	16,129	0,019	129.067,52	130.260,20	1.686,71	0,302	82,889
FALSE	J Bp4	UNKN	16,116	16,129	0,019	131.452,89	130.260,20	1.686,71	0,302	82,889
FALSE	O R2	UNKN	15,910	15,934	0,033	151.637,31	149.221,84	3.415,99	0,302	83,024
FALSE	O R2	UNKN	15,957	15,934	0,033	146.806,38	149.221,84	3.415,99	0,302	83,024
FALSE	K Bp1	UNKN	17,050	17,100	0,070	68.619,05	66.324,83	3.244,53	0,302	82,889
FALSE	K Bp1	UNKN	17,149	17,100	0,070	64.030,60	66.324,83	3.244,53	0,302	82,755
FALSE	O Bp1	UNKN	16,246	16,210	0,051	120.047,11	123.147,65	4.384,82	0,302	82,889
FALSE	O Bp1	UNKN	16,174	16,210	0,051	126.248,19	123.147,65	4.384,82	0,302	82,889
FALSE	G R1	UNKN	17,334	17,328	0,009	56.307,83	56.559,02	355,23	0,302	82,755
FALSE	G R1	UNKN	17,321	17,328	0,009	56.810,21	56.559,02	355,23	0,302	82,889
FALSE	O Bp2	UNKN	15,994	16,028	0,048	143.026,42	139.756,84	4.623,89	0,302	83,024
FALSE	O Bp2	UNKN	16,062	16,028	0,048	136.487,25	139.756,84	4.623,89	0,302	83,024

Priloga U: Izpis programa ViiA 7.0 za qPCR TaqMan s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za ugotavljanje števila vseh fuzobakterijskih tarč v vzorcih.

Block Type	384-Well Block				Reporter	FAM			
Chemistry	TAQMAN				Quencher	TAMRA			
Experiment Barcode					Target Name	Fuso			
Experiment Comments									
Experiment File Name	2013-12-10 100832_TaqMan_vzorci.eds								
Experiment Name	2013-12-10 100832								
Experiment Run End Time	2013-12-10 14:16:10 PM CET								
Experiment Type	Standard Curve								
Experiment User Name									
Instrument Name	Rodica								
Instrument Serial Number	278881087								
Instrument Type	ViiA 7								
Passive Reference	ROX								
Quantification Cycle Method	Ct								
Signal Smoothing On	false								
Stage/ Cycle where Analysis is performed	Stage 2, Step 2								
Omit	Sample Name	Task	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Ct Threshold
FALSE	A Bp2	UNKN	38,332	38,442	0,127	69,983	65,620	4,950	0,082
FALSE	A Bp2	UNKN	38,413	38,442	0,127	66,636	65,620	4,950	0,082
FALSE	A Bp2	UNKN	38,581	38,442	0,127	60,240	65,620	4,950	0,082
FALSE	G R4	UNKN	40,735	40,948	0,317	16,462	14,656	2,638	0,082
FALSE	G R4	UNKN	40,795	40,948	0,317	15,878	14,656	2,638	0,082
FALSE	G R4	UNKN	41,312	40,948	0,317	11,629	14,656	2,638	0,082
FALSE	P Bp2	UNKN	39,427	39,487	0,130	36,203	34,973	2,672	0,082
FALSE	P Bp2	UNKN	39,636	39,487	0,130	31,908	34,973	2,672	0,082
FALSE	P Bp2	UNKN	39,399	39,487	0,130	36,809	34,973	2,672	0,082
FALSE	H R1	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	H R1	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	H R1	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	K R	UNKN	43,312	43,284	0,040	3,489	3,548	0,085	0,082
FALSE	K R	UNKN	43,256	43,284	0,040	3,608	3,548	0,085	0,082
FALSE	P R1	UNKN	34,109	33,973	0,192	890,169	969,188	111,750	0,082
FALSE	P R1	UNKN	33,837	33,973	0,192	1,048,206	969,188	111,750	0,082
FALSE	A Bp3	UNKN	40,102	40,261	0,448	24,104	22,411	5,609	0,082
FALSE	A Bp3	UNKN	40,767	40,261	0,448	16,151	22,411	5,609	0,082
FALSE	A Bp3	UNKN	39,915	40,261	0,448	26,979	22,411	5,609	0,082
FALSE	L Bp2	UNKN	30,266	30,784	0,486	9,005,429	6,783,906	2,026,151	0,082
FALSE	L Bp2	UNKN	31,231	30,784	0,486	5,037,601	6,783,906	2,026,151	0,082
FALSE	L Bp2	UNKN	30,857	30,784	0,486	6,308,690	6,783,906	2,026,151	0,082
FALSE	Std1	STAN	27,031	27,291	0,376	23,200,000			0,082
FALSE	Std1	STAN	27,722	27,291	0,376	23,200,000			0,082
FALSE	Std1	STAN	27,119	27,291	0,376	23,200,000			0,082
FALSE	A Bp4	UNKN	43,450	43,551	0,142	3,209	3,027	0,259	0,082
FALSE	A Bp4	UNKN	43,651	43,551	0,142	2,844	3,027	0,259	0,082
FALSE	L Bp3	UNKN	34,099	34,252	0,147	895,182	818,578	72,945	0,082
FALSE	L Bp3	UNKN	34,264	34,252	0,147	810,605	818,578	72,945	0,082
FALSE	L Bp3	UNKN	34,393	34,252	0,147	749,948	818,578	72,945	0,082
FALSE	R R	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	R R	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	R R	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	Std2	STAN	31,221	31,451	0,199	4,640,000			0,082
FALSE	Std2	STAN	31,565	31,451	0,199	4,640,000			0,082
FALSE	Std2	STAN	31,566	31,451	0,199	4,640,000			0,082
FALSE	B Bp3	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	B Bp3	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	B Bp3	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	H Bp4	UNKN	39,766	39,913	0,137	29,502	27,078	2,258	0,082
FALSE	H Bp4	UNKN	39,932	39,913	0,137	26,696	27,078	2,258	0,082
FALSE	H Bp4	UNKN	40,039	39,913	0,137	25,036	27,078	2,258	0,082
FALSE	Std3	STAN	33,713	33,727	0,089	928,000			0,082
FALSE	Std3	STAN	33,646	33,727	0,089	928,000			0,082
FALSE	Std3	STAN	33,821	33,727	0,089	928,000			0,082

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge U«

Omit	Sample Name	Task	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Ct Threshold
FALSE	B Bp4	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	B Bp4	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	B Bp4	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	I R1	UNKN	44,422	44,383	0,055	1,787	1,830	0,061	0,082
FALSE	I R1	UNKN	44,344	44,383	0,055	1,873	1,830	0,061	0,082
FALSE	L R1	UNKN	32,810	32,884	0,078	1.946,299	1.862,381	87,555	0,082
FALSE	L R1	UNKN	32,966	32,884	0,078	1.771,593	1.862,381	87,555	0,082
FALSE	L R1	UNKN	32,877	32,884	0,078	1.869,252	1.862,381	87,555	0,082
FALSE	R Bp2	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	R Bp2	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	R Bp2	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	Std4	STAN	37,175	37,086	0,078	185,600			0,082
FALSE	Std4	STAN	37,056	37,086	0,078	185,600			0,082
FALSE	Std4	STAN	37,027	37,086	0,078	185,600			0,082
FALSE	B Bp5	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	B Bp5	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	B Bp5	UNKN	Undetermined						0,082
FALSE	M R1	UNKN	35,484	35,516	0,067	388,777	381,581	15,152	0,082
FALSE	M R1	UNKN	35,593	35,516	0,067	364,172	381,581	15,152	0,082
FALSE	M R1	UNKN	35,472	35,516	0,067	391,794	381,581	15,152	0,082
FALSE	Std5	STAN	39,256	39,167	0,126	37,120			0,082
FALSE	Std5	STAN	39,079	39,167	0,126	37,120			0,082
FALSE	C Bp1	UNKN	39,301	39,622	0,280	39,037	32,502	5,701	0,082
FALSE	C Bp1	UNKN	39,743	39,622	0,280	29,926	32,502	5,701	0,082
FALSE	C Bp1	UNKN	39,821	39,622	0,280	28,544	32,502	5,701	0,082
FALSE	I Bp1	UNKN	44,760	44,494	0,376	1,458	1,734	0,390	0,082
FALSE	I Bp1	UNKN	44,228	44,494	0,376	2,009	1,734	0,390	0,082
FALSE	M Bp1	UNKN	33,097	33,161	0,178	1.637,418	1.580,777	164,845	0,082
FALSE	M Bp1	UNKN	33,025	33,161	0,178	1.709,835	1.580,777	164,845	0,082
FALSE	M Bp1	UNKN	33,363	33,161	0,178	1.395,079	1.580,777	164,845	0,082
FALSE	C Bp2	UNKN	40,705	41,090	0,338	16,766	13,487	2,868	0,082
FALSE	C Bp2	UNKN	41,339	41,090	0,338	11,442	13,487	2,868	0,082
FALSE	C Bp2	UNKN	41,226	41,090	0,338	12,252	13,487	2,868	0,082
FALSE	M Bp2	UNKN	30,781	30,849	0,078	6.603,928	6.341,553	296,448	0,082
FALSE	M Bp2	UNKN	30,935	30,849	0,078	6.019,968	6.341,553	296,448	0,082
FALSE	M Bp2	UNKN	30,833	30,849	0,078	6.400,764	6.341,553	296,448	0,082
FALSE	S R	UNKN	35,656	35,247	0,368	350,629	455,704	95,868	0,082
FALSE	S R	UNKN	35,141	35,247	0,368	478,070	455,704	95,868	0,082
FALSE	S R	UNKN	34,944	35,247	0,368	538,412	455,704	95,868	0,082
FALSE	NTC	Undetermined							0,082
FALSE	NTC	Undetermined							0,082
FALSE	NTC	Undetermined							0,082
FALSE	C R2	UNKN	40,251	39,839	0,401	22,031	28,793	6,831	0,082
FALSE	C R2	UNKN	39,450	39,839	0,401	35,691	28,793	6,831	0,082
FALSE	C R2	UNKN	39,815	39,839	0,401	28,659	28,793	6,831	0,082
FALSE	D Bp	UNKN	43,865	44,063	0,254	2,500	2,236	0,329	0,082
FALSE	D Bp	UNKN	43,975	44,063	0,254	2,340	2,236	0,329	0,082
FALSE	D Bp	UNKN	44,350	44,063	0,254	1,867	2,236	0,329	0,082
FALSE	J R2	UNKN	Undetermined	49,942					0,082
FALSE	J R2	UNKN	Undetermined	49,942					0,082
FALSE	J R2	UNKN	49,942	49,942		0,064	0,064		0,082
FALSE	N R2	UNKN	41,205	40,896	0,296	12,406	15,101	2,645	0,082
FALSE	N R2	UNKN	40,616	40,896	0,296	17,692	15,101	2,645	0,082
FALSE	N R2	UNKN	40,867	40,896	0,296	15,207	15,101	2,645	0,082
FALSE	S Bp2	UNKN	45,230	45,218	0,017	1,099	1,107	0,011	0,082
FALSE	S Bp2	UNKN	45,206	45,218	0,017	1,115	1,107	0,011	0,082

»se nadaljuje«

»nadaljevanje priloge U«

Omit	Sample Name	Task	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Ct Threshold		
FALSE	D R1	UNKN	44,385	44,232	0,239	1,828	2,018	0,301	0,082		
FALSE	D R1	UNKN	43,957	44,232	0,239	2,365	2,018	0,301	0,082		
FALSE	D R1	UNKN	44,355	44,232	0,239	1,861	2,018	0,301	0,082		
FALSE	J Bp1	UNKN	41,650	41,766	0,350	9,488	8,979	1,795	0,082		
FALSE	J Bp1	UNKN	41,488	41,766	0,350	10,464	8,979	1,795	0,082		
FALSE	J Bp1	UNKN	42,159	41,766	0,350	6,984	8,979	1,795	0,082		
FALSE	N Bp1	UNKN	39,193	39,084	0,145	41,671	44,603	3,978	0,082		
FALSE	N Bp1	UNKN	38,919	39,084	0,145	49,131	44,603	3,978	0,082		
FALSE	N Bp1	UNKN	39,141	39,084	0,145	43,006	44,603	3,978	0,082		
FALSE	D R4	UNKN	44,276	44,437	0,228	1,952	1,780	0,243	0,082		
FALSE	D R4	UNKN	44,598	44,437	0,228	1,607	1,780	0,243	0,082		
FALSE	J Bp3	UNKN	39,006	38,793	0,185	46,639	53,247	5,727	0,082		
FALSE	J Bp3	UNKN	38,692	38,793	0,185	56,348	53,247	5,727	0,082		
FALSE	J Bp3	UNKN	38,680	38,793	0,185	56,754	53,247	5,727	0,082		
FALSE	N Bp2	UNKN	38,409	38,226	0,173	66,811	74,857	7,686	0,082		
FALSE	N Bp2	UNKN	38,203	38,226	0,173	75,635	74,857	7,686	0,082		
FALSE	N Bp2	UNKN	38,066	38,226	0,173	82,124	74,857	7,686	0,082		
FALSE	J Bp4	UNKN	39,528	39,665	0,150	34,051	31,438	2,802	0,082		
FALSE	J Bp4	UNKN	39,643	39,665	0,150	31,784	31,438	2,802	0,082		
FALSE	J Bp4	UNKN	39,825	39,665	0,150	28,479	31,438	2,802	0,082		
FALSE	O R2	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	O R2	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	O R2	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	K Bp1	UNKN	Undetermined		49,594						
FALSE	K Bp1	UNKN	Undetermined		49,594						
FALSE	K Bp1	UNKN	49,594	49,594			0,079	0,079	0,082		
FALSE	O Bp1	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	O Bp1	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	O Bp1	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	G R1	UNKN	40,701	40,709	0,012	16,810	16,723	0,123	0,082		
FALSE	G R1	UNKN	40,718	40,709	0,012	16,636	16,723	0,123	0,082		
FALSE	O Bp2	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	O Bp2	UNKN	Undetermined						0,082		
FALSE	O Bp2	UNKN	Undetermined						0,082		

Priloga V: Izračuni programa SPSS za Wilcoxon test s katerim smo ugotavljali statistično značilno povečanje oziroma zmanjšanje števila fuzobakterijskih tarč v vzorcih tumorsko spremenjene sluznice, glede na nespremenjeno sluznico debelega črevesa.

Priloga V1: Izpis Wilcoxon testa za vse vzorce skupaj.

Wilcoxon Signed Ranks Test

Comparison		N	Mean Rank	Sum of Ranks
All samples	Negative Ranks	3 ^a	5,67	17,00
	Positive Ranks	9 ^b	6,78	61,00
	Ties	0 ^c		
	Total	12		

(a) cancer < healthy (b) cancer > healthy (c) cancer = healthy

Test Statistics^a

	Vsi vzorci
Z	-1,726 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,084

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

Priloga V2: Izpis Wilcoxon testa posebej pri vzorcih z diagnozo adenoma in posebej pri vzorcih z diagnozo adenokarcinoma.

Wilcoxon Signed Ranks Test

Comparison		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adenokarcinom	Negative Ranks	1 ^a	1,00	1,00
	Positive Ranks	3 ^b	3,00	9,00
	Ties	0 ^c		
	Total	4		
Adenom	Negative Ranks	2 ^a	5,00	10,00
	Positive Ranks	6 ^b	4,33	26,00
	Ties	0 ^c		
	Total	8		

(a) cancer < healthy (b) cancer > healthy (c) cancer = healthy

Test Statistics^a

Status		cancer - healthy
Adenokarcinom	Z	-1,461 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,144
Adenom		-1,120 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,263

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

Priloga W: Izračuni programa SPSS za Mann-Whitney test s katerim smo ugotavljali statistično značilne razlike med odstotki podobnosti DGGE profilov pomnožkov mikrobnih genov za 16S rRNA.

Priloga W1: Izpis Mann-Whitney testa pri primerjanju podobnosti med profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz istega predela prebavnega trakta, s podobnostjo med profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti vzdolž prebavnega trakta.

Ranks

	VAR00005	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Comparison	A	19	22,47	427,00
	B	19	16,53	314,00
	Total	38		

A = % podobnosti med profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz istega predela prebavnega trakta

B = % podobnosti med profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili vzdolž prebavnega trakta

Test Statistics^a

Comparison	A : B
Mann-Whitney U	124,000
Wilcoxon W	314,000
Z	-1,653
Asymp. Sig. (2-tailed)	,098
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,103 ^b

a. Grouping Variable: VAR00005

b. Not corrected for ties.

Priloga W2: Izpis Mann-Whitney testa pri primerjanju podobnosti med profili vzorcev nespremenjene sluznice, s podobnostjo med profili vzorcev nespremenjene in tumorsko spremenjene sluznice.

Ranks

	VAR00005	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Comparison	A	33	46,67	1540,00
	C	33	20,33	671,00
	Total	66		

A = % podobnosti med profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz istega predela prebavnega trakta

C = % podobnosti med profili vzorcev nespremenjene sluznice, ki so bili odvzeti iz istega predela prebavnega trakta in tumorsko spremenjene sluznice

Test Statistics^a

Comparison	A : C
Mann-Whitney U	110,000
Wilcoxon W	671,000
Z	-5,577
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: VAR00005