Mikrobiom jako biomarker v medicíně

Lidský mikrobiom/lidská mikrobiota

Martin Krsek

Ústav ochrany a podpory zdraví

Lékařská fakulta MU Brno

Samostudium

Autoři

Curtis Huttenhower[1,2]*, Dirk Gevers[2]*, Rob Knight[3,4], Sahar Abubucker[5], Jonathan H. Badger[6], Asif T. Chinwalla[5], Heather H. Creasy[7], Ashlee M. Earl[2], Michael G. FitzGerald[2], Robert S. Fulton[5], Michelle G. Giglio[7], Kymberlie Hallsworth-Pepin[5], Elizabeth A. Lobos[5], Ramana Madupu[6], Vincent Magrini[5], John C. Martin[5], Makedonka Mitreva[5], Donna M. Muzny[8], Erica J. Sodergren[5], James Versalovic[9,10], Aye M. Wollam[5], Kim C. Worley[8], Jennifer R. Wortman[7], Sarah K. Young[2], Qiandong Zeng[2], Kjersti M. Aagaard[11], Olukemi O. Abolude[7], Emma Allen-Vercoe[12], Eric J. Alm[13,2], Lucia Alvarado[2], Gary L. Andersen[14], Scott Anderson[2], Elizabeth Appelbaum[5], Harindra M. Arachchi[2], Gary Armitage[15], Cesar A. Arze[7], Tulin Ayvaz[16], Carl C. Baker[17], Lisa Begg[18], Tsegahiwot Belachew[19], Veena Bhonagiri[5], Monika Bihan[6], Martin J. Blaser[20], Toby Bloom[2], Vivien Bonazzi[21], J. Paul Brooks[22,23], Gregory A. Buck[23,24], Christian J. Buhay[8], Dana A. Busam[6], Joseph L. Campbell[21,19], Shane R. Canon[25], Brandi L. Cantarel[7], Patrick S. G. Chain[26,27], I-Min A. Chen[28], Lei Chen[5], Shaila Chhibba[21], Ken Chu[28], Dawn M. Ciulla[2], Jose C. Clemente[3], Sandra W. Clifton[5], Sean Conlan[79], Jonathan Crabtree[7], Mary A. Cutting[29], Noam J. Davidovics[7], Catherine C. Davis[30], Todd Z. DeSantis[31], Carolyn Deal[19], Kimberley D. Delehaunty[5], Floyd E. Dewhirst[32,33], Elena Deych[34], Yan Ding[8], David J. Dooling[5], Shannon P. Dugan[8], Wm Michael Dunne[35,36], A. Scott Durkin[6], Robert C. Edgar[37], Rachel L. Erlich[2], Candace N. Farmer[5], Ruth M. Farrell[38], Karoline Faust[39,40], Michael Feldgarden[2], Victor M. Felix[7], Sheila Fisher[2], Anthony A. Fodor[41], Larry J. Forney[42], Leslie Foster[6], Valentina Di Francesco[19], Jonathan Friedman[43], Dennis C. Friedrich[2], Catrina C. Fronick[5], Lucinda L. Fulton[5], Hongyu Gao[5], Nathalia Garcia[44], Georgia Giannoukos[2], Christina Giblin[19], Maria Y. Giovanni[19], Jonathan M. Goldberg[2], Johannes Goll[6], Antonio Gonzalez[45], Allison Griggs[2], Sharvari Gujja[2], Susan Kinder Haake[46], Brian J. Haas[2], Holli A. Hamilton[29], Emily L. Harris[29], Theresa A. Hepburn[2], Brandi Herter[5], Diane E. Hoffmann[47], Michael E. Holder[8], Clinton Howarth[2], Katherine H. Huang[2], Susan M. Huse[48], Jacques Izard[32,33], Janet K. Jansson[49], Huaiyang Jiang[8], Catherine Jordan[7], Vandita Joshi[8], James A. Katancik[50], Wendy A. Keitel[16], Scott T. Kelley[51], Cristyn Kells[2], Nicholas B. King[52], Dan Knights[45], Heidi H. Kong[53], Omry Koren[54], Sergey Koren[55], Karthik C. Kota[5], Christie L. Kovar[8], Nikos C. Kyrpides[27], Patricio S. La Rosa[34], Sandra L. Lee[8], Katherine P. Lemon[32,56], Niall Lennon[2], Cecil M. Lewis[57], Lora Lewis[8], Ruth E. Ley[54], Kelvin Li[6], Konstantinos Liolios[27], Bo Liu[55], Yue Liu[8], Chien-Chi Lo[26], Catherine A. Lozupone[3], R. Dwayne Lunsford[29], Tessa Madden[58], Anup A. Mahurkar[7], Peter J. Mannon[59], Elaine R. Mardis[5], Victor M. Markowitz[27,28], Konstantinos Mavromatis[27], Jamison M. McCorrison[6], Daniel McDonald[3], Jean McEwen[21], Amy L. McGuire[60], Pamela McInnes[29], Teena Mehta[2], Kathie A. Mihindukulasuriya[5], Jason R. Miller[6], Patrick J. Minx[5], Irene Newsham[8], Chad Nusbaum[2], Michelle O'Laughlin[5], Joshua Orvis[7], Ioanna Pagani[27], Krishna Palaniappan[28], Shital M. Patel[61], Matthew Pearson[2], Jane Peterson[21], Mircea Podar[62], Craig Pohl[5], Katherine S. Pollard[63,64,65], Mihai Pop[55,66], Margaret E. Priest[2], Lita M. Proctor[21], Xiang Qin[8], Jeroen Raes[39,40], Jacques Ravel[7], Jeffrey G. Reid[8], Mina Rho[67], Rosamond Rhodes[68], Kevin P. Riehle[69], Maria C. Rivera[23,24], Beltran Rodriguez-Mueller[51], Yu-Hui Rogers[6], Matthew C. Ross[16], Carsten Russ[2], Ravi K. Sanka[6], Pamela Sankar[70], J. Fah Sathirapongsasuti[1], Jeffery A. Schloss[21], Patrick D. Schloss[71], Thomas M. Schmidt[72], Matthew Scholz[26], Lynn Schriml[7], Alyxandria M. Schubert[71], Nicola Segata[1], Julia A. Segre[79], William D. Shannon[34], Richard R. Sharp[38],

Laboratoře

National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. [19]National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. [20]Department of Medicine, New York University Langone Medical Center, New York, New York 10016, USA. [21]National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. [22]Department of Statistical Sciences and Operations Research, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23284, USA. [23]Center for the Study of Biological Complexity, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23284, USA. [24]Department of Biology, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23284, USA. [25]Technology Integration Group, National Energy Research Scientific Computing Center, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California 94720, USA. [26]Genome Science Group, Bioscience Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545, USA. [27]Joint Genome Institute, Walnut Creek, California 94598, USA. [28]Biological Data Management and Technology Center, Computational Research Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California 94720, USA. [29]National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR), National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA. [30]FemCare Product Safety and Regulatory Affairs, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio 45224, USA. [31]Bioinformatics Department, Second Genome, Inc., San Bruno, California 94066, USA. [32]Department of Molecular Genetics, Forsyth Institute, Cambridge, Massachusetts 02142, USA. [33]Department of Oral Medicine, Infection and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Boston, Massachusetts 02115, USA. [34]Department of Medicine, Division of General Medical Science, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110, USA. [35]Department of Pathology & Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110, USA. [36]bioMerieux, Inc., Durham, South Carolina 27712, USA. [37]drive5.com, Tiburon, California 94920, USA. [38]Center for Ethics, Humanities and Spiritual Care, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio 44195, USA. [39]Department of Structural Biology, VIB, Belgium, 1050 Ixelles, Belgium. [40]Department of Applied Biological Sciences (DBIT), Vrije Universiteit Brussel, 1050 Ixelles, Belgium. [41]Department of Bioinformatics and Genomics, University of North Carolina - Charlotte, Charlotte, North Carolina 28223, USA. [42]Department of Biological Sciences, University of Idaho, Moscow, Idaho 83844, USA. [43]Computational and Systems Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts 02139, USA. [44]Center for Advanced Dental Education, Saint Louis University, St. Louis, Missouri 63104, USA. [45]Department of Computer Science, University of Colorado, Boulder, Colorado 80309, USA. [46]Division of Associated Clinical Specialties and Dental Research Institute, UCLA School of Dentistry, Los Angeles, California 90095, USA. [47]University of Maryland Francis King Carey School of Law, Baltimore, Maryland 21201, USA. [48]Josephine Bay Paul Center, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts 02543, USA. [49]Ecology Department, Earth Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California 94720, USA. [50]Department of Periodontics, University of Texas Health Science Center School of Dentistry, Houston, Texas 77030, USA. [51]Department of Biology, San Diego State University, San Diego, California 92182, USA. [52]Faculty of Medicine, McGill University, 3647 Peel St, Montreal, Quebec H3A 1X1, Canada. [53]Dermatology Branch, CCR, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20892, USA. [54]Department of Microbiology, Cornell

Děkuji za pozornost!

Jaká je hlavní úloha mikrobů na Zemi?

- degradace

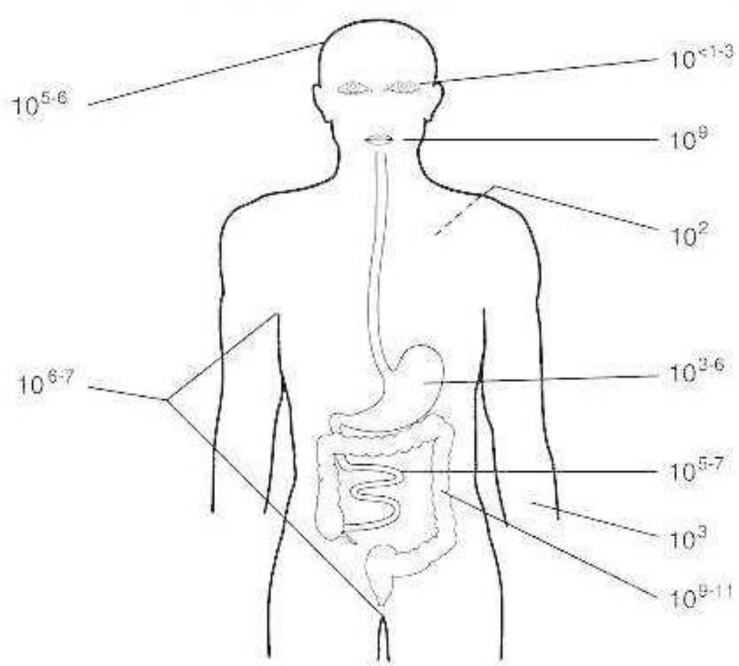
- koloběh živin

- fotosyntéza

- interakce s rostlinami a živočichy

- udržovat život na Zemi

Mikrobi a naše tělo



Kůže – 10^{12}, ústa – 10^{10}, zažívací trakt - 10^{14}

Kolik buněk má naše tělo?

5 miliard (10^9) – 200 miliónů triliónů (10^{18}) ?

Průměrná váha - 70 triliónů buněk (10^{12})

Průměrný objem – 15 triliónů buněk (10^{12})

Snad tedy 37.2 triliónů buněk (10^{12}) ?

Celkový poměr lidských a bakteriálních buněk je

1 : 1-10

Co tedy vlastně jsme?!

Význam normální mikrobioty

- **ovlivňuje anatomii, fyziologii, citlivost k patogenům a morbiditu hostitele**

- **je relativně stabilní (určité rody osídlují různé oblasti těla během určitých období života člověka)**

- **většinou je neškodná, ale…**

Význam normální mikrobioty

Germ-free (axenická) zvířata (intestinal atonia)

- alimentární lamina propria nevyvinutá, málo nebo žádný immunoglobulin v séru nebo sekretech, redukovaná intestinální motilita, intenzita obnovy intestinálních epitelových buněk zhruba poloviční ve srovnání s normálními zvířaty
- žijí déle, ale b**ez mikrobů to nejde, jsme na ně připraveni (máme bariéry, dokonce i z nich)**

Zvířata ošetřená streptomycínem po infekci streptomycin-rezistentní bakterií *Salmonella*:

- 10^6 buněk x méně než 10 k ustanovení gastrointestinální infekce
- fermentační produkty (acetic and butyric acids) produkované normální mikroflorou inhibují růst bakterií *Salmonella*

Mikrobiota kůže

- dospělý člověk – 2 m^2 kůže - neustálý kontakt s vnějším prostředím

- různé oblasti kůže = geografické oblasti zeměkoule

    - mastné, upocené (hlava, krk, trup) – produkce kožního mazu *Propionbacterium* spp.
    - vlhké oblasti – *Corynebacterium* spp.
    - suché oblasti (největší diverzita) – *Staphylococcus* spp.

- různé mikrobiální komunity i v různých vrstvách kůže

Mikrobiota kůže

- většina bakterií se soustřeďuje do potních žláz

- G+ koky - *Staphylococcus epidermidis*
    - sekrece antimikrobiálních látek
    - ale i život ohrožující infekce v nemocnicích
        - katetry a chirurgické zákroky

- corynebacteria – např. *Propionibacterium acnes* – nepatogenní (?)
    - z lipidů na kůži dělá SCFA – opět obrana
    - ale dostane-li se do vlasového folikulu, pórů nebo kožních žláz, může způsobit zánět nebo akné

Mikrobiota kůže a imunita

P. acnes – kmeny na zdravé kůži mají geny pro thiopeptidy, které inhibující G+ druhy (v kultuře inhibují *Staphylococcus epidermidis*)
P. acnes způsobující akné je neprodukují

S. epidermidis – sekrece lipoteichoové kyseliny – prevence uvolnění zánětlivých cytokinů z buněk kůže

Přidání *S.epidermidis* na kůži sterilních myší podpořilo imunitu (T-buňky)

Různí mikrobi ovlivňují rozdílné části imunitního systému

Někteří mikrobi produkují antimikrobiální látky, jiní naopak indukují uvolňování cytokinů spojených s nemocemi

Kožní probiotika? Návrat k „přirozenému“ stavu?

Mikrobiota ústní dutiny

- hlavní vstupní brána těla pro nové mikroby
- každý den do ní vstoupí nesčetné množství mikrobů
- zůstanou zde, nebo jdou dál

- 1676 – Anthonie van Leewenhoek – „animacules“
- 1890 – W.D.Miller – The microorganisms of the Human Mouse
- 2016 – Jakubovics – struktura dentálního plaku

Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD)

- November 22, 2017
- 772 prokaryotic species (70% kultivovatelných)
- 16S rDNA – 6 kmenů: *Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes* a *Spirochaetes = 96%*

Mikrobiota ústní dutiny

- společný vývoj s námi po milióny let
  - využití ohně, zemědělství, zpracované potraviny (cukr), antimikrobiální terapie

- závislé na věku:
  - po narození - *Streptococcus salivarius (*98%)
  - prořezávání zubů *S. mutans* (lactic acid) a *S. sanguinis*
  - Bacteroides a Spirochetes kolem puberty

Mikrobiota ústní dutiny

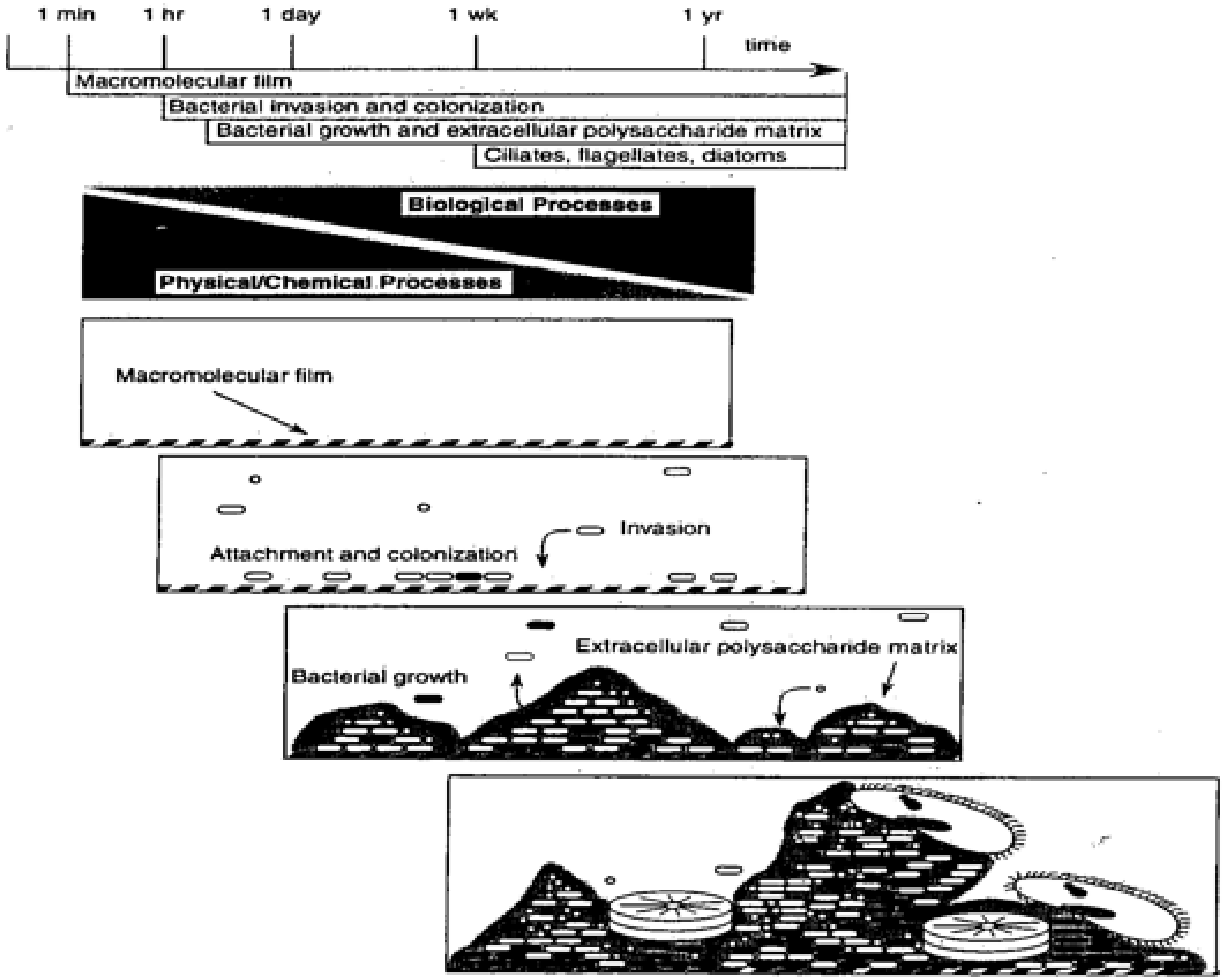
Tři habitaty

- sliznice tváří, dásně, tvrdé patro – Firmicutes, *Streptococcus sp.*
- hrdlo, mandle, hřbet jazyka, sliny – *Veillonella spp., Neisseria spp., Leptotrichia spp.*
- dentální plak – *Capnocytophaga spp., Actinomyces spp., Rothia spp.* a *Corynebacterium* spp.

Ústa – teplo, vlhko, živiny – sliny, crevikulární tekutina dásní

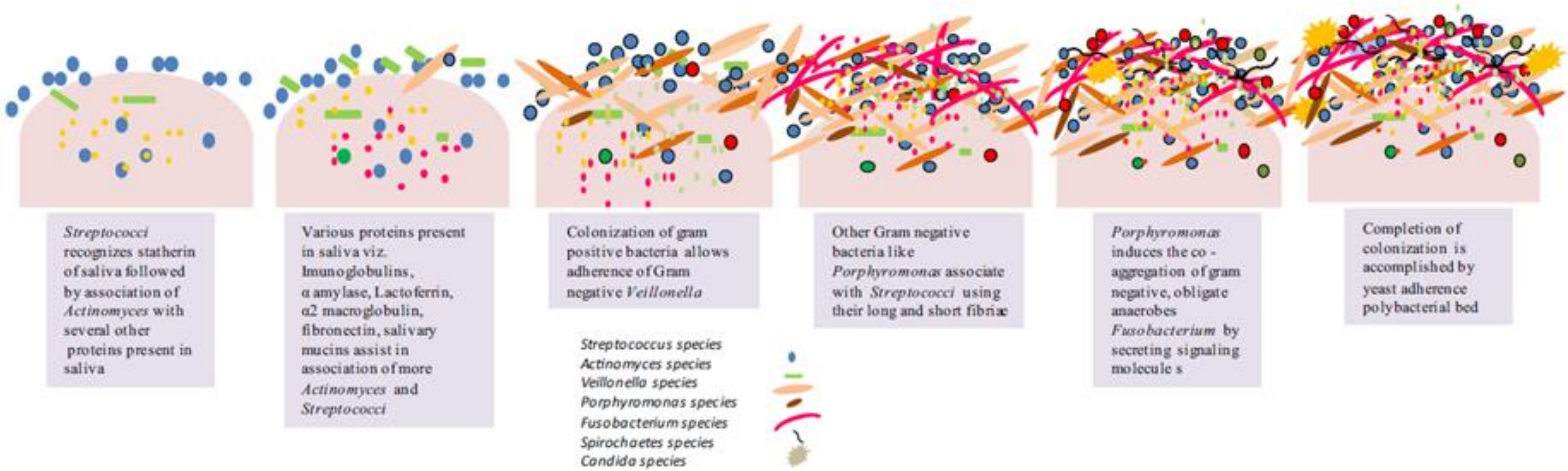
- proteiny, glykoproteiny
- immunoglobulin A, lactoferin, lactoperoxidase, lysozyme, statherin, histatin
- **výsledkem** je vyvážená mikrobiota
- tyto látky spolu s ostatními (i mikrobiální) vytváří **biofilm** umožňující mikrobům jejich uchycení a zároveň chrání zuby proti ataku kyselin

Tvorba biofilmu obecně



Atlas, Bartha 1981

Mikrobiota ústní dutiny – tvorba biofilmu



- nejprve fyzikální proces – pokrytí povrchů filmem z rozpuštěných látek
- poté (minuty) – reverzibilní přichycení mikrobů – ireverzibilní
- orální bakterie – různé adheziny – interakce s molekulami a receptory na ostatních bakteriích
- *Streptococcus spp., Actinomycetes spp., Veillonella spp., Porphyromonas spp., Fusobacterium spp., Spirochetes spp., Candida spp.*

Mikrobiota ústní dutiny

Biofilm

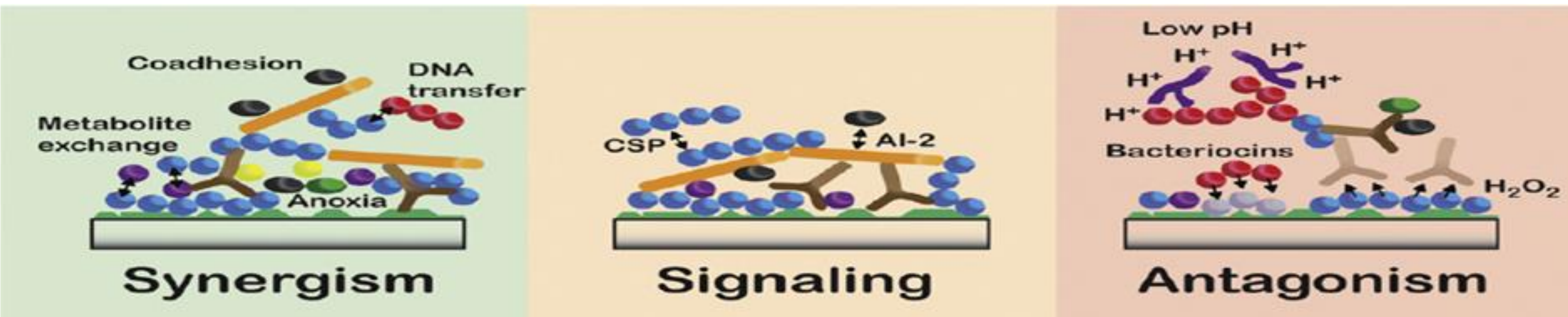
- **koadheze** pozdějších kolonizátorů na již přichycené předešlé
- zvýšená diverzita a biomasa biofilmu
- význam bakteriálních **polymerů** (glukany, fruktany, heteropolymery)
- **matrix** – živiny, voda, enzymy
    - gradient – pH, O_2, živiny

- regulace exprese genů – odlišná od stejných planktonických mikrobů
- usnadněný horizontální transfer genů
- quorum sensing peptidy zvýšily frekvenci transformace u *S. mutans* 10-600x
- zvýšená rezistence k antimikrobiálním látkám

Mikrobiota ústní dutiny

Dentální plak

- bakterie žijící vedle sebe využívají různé živiny, produkují různé látky: synergismus, indukce odezvy v cílových buňkách a kompetice



- stejná látka – různá funkce – dle situace, koncentrace
- H_2O_2 – inhibice, ale v subletálních koncentracích signální funkce
- podobně organické kyseliny, bakteriociny – antagonismus, synergismus
- bakteriociny – kompetence buněk, uvolnění DNA

Zubní plak a dentální nemoci

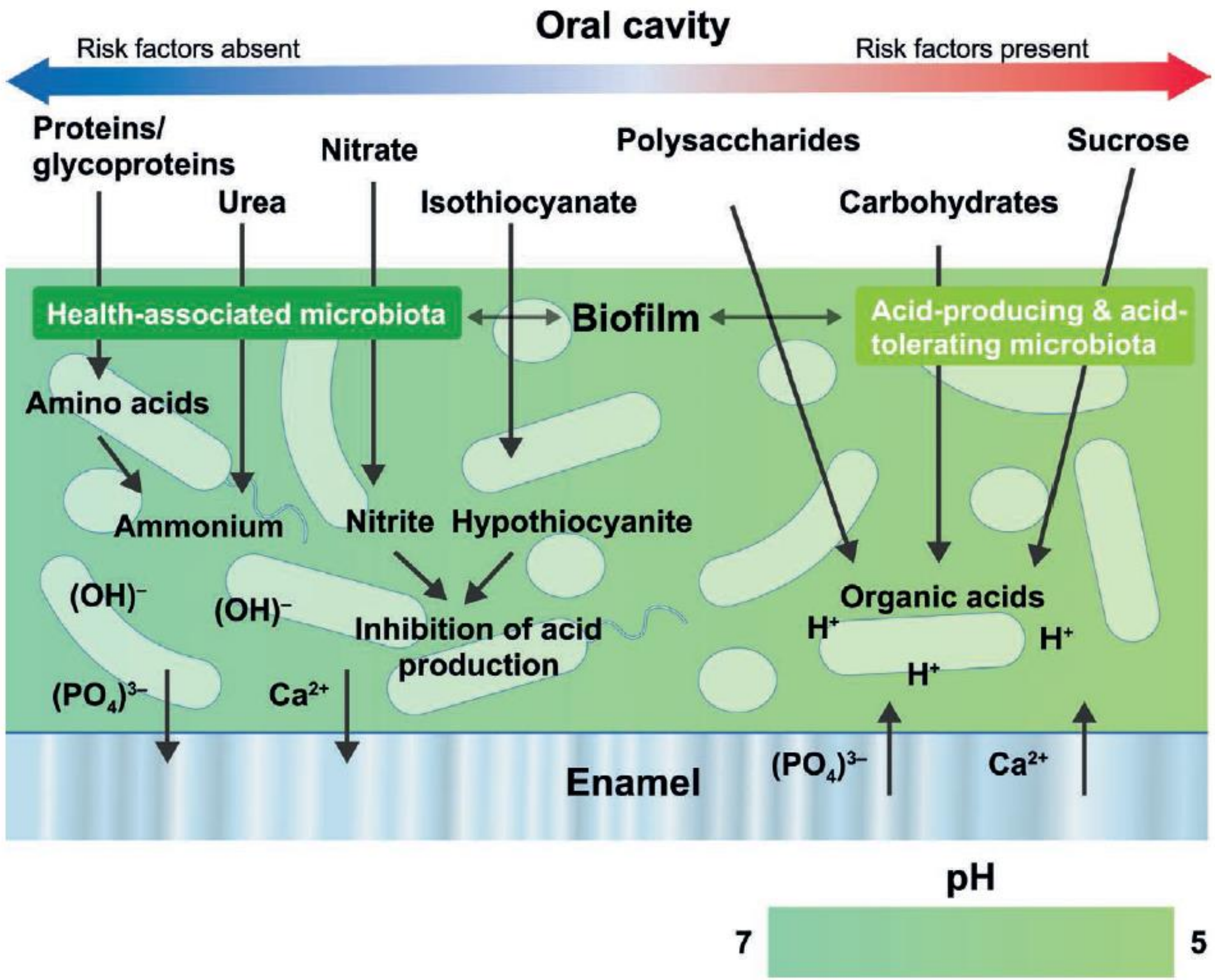


Fig. 6 A contemporary model of host–microbe interactions in the pathogenesis of caries (adapted from de Soet & Zaura and Takahashi)[97,51]

Úloha normální mikrobioty ústní dutiny

- **pouhá přítomnost** inhibuje kolonizaci potenciálními patogeny GIT

- **metabolismus nitrátů** a kardiovaskulární nemoci
- ¼ přijatých nitrátů se vrátí do dutiny ústní (sliny…)
- mikrobiota přemění nitráty na nitrity – ty do krve a přeměna na NO
- NO – zásadní pro zdraví cév – pružnost, ohebnost – snížení tlaku
- ale i erekce, uvolnění svalstva v trávicí soustavě – posun potravy
- použití antibakteriální ústní vody výrazně snížilo příjem nitritů, zrušilo účinek nitritů na snižování krevního tlaku

- probiotika – *Streptococcus salivarius* (bakteriociny) x *S.pyogenes* (faryngitida, revmatická horečka)

- Ale na druhé straně souvislost se systemickými chorobami: metastatické infekce srdce, mozku, sleziny, slinivky břišní, jater, a kostí, arteroskleróza, kardiovaskulární onemocnění, mrtvice, onemocnění dýchacích cest, meningitida, zápal plic, cukrovka

Mikrobiota a obezita

- GM obézních jedinců vykazuje <u>zvláštní metabolismus uhlovodíků a tuků</u>
- GM je schopen trávit lidskými enzymy nestravitelné polysacharidy
- <u>výsledkem je energie</u>, <u>SCFAs</u> – ty zase ovlivňují metabolismus glukózy, cholesterolu a tuků v různých tkáních
- germ free myši a vysoce kalorická dieta

- západní dieta (moc tuků) redukuje *Bacteroides* a zvyšuje *Firmicutes*
- *Prevotellaceae* (produkce H) a archea hojné u obézních jedinců
  - transfer H mezi bakteriemi a archeemi může zvýšit příjem energie v GIT (*Methanobrevibacter smithii)*

- GM aktivuji žlučové kyseliny a zúčastní se jejich regulace a metabol.
- žlučové kyseliny pomáhají absorpci lipidů

Manipulace lidského mikrobiomu
(terapie založené na využití mikrobioty-zdravotní přínos)

- **probiotika** (resistence původní mikroflóry) – 100 let – Mutaflor

- **prebiotika –** nestravitelná část potravy
  - celuloza, hemiceluloza, lignin
  - ale i polyfenoly (rosveratrol – červené víno), minerály
  - vitamíny – riboflamin

- **synbiotika =** probiotika + prebiotika (podpora nejen podávaného probiotika)

- **postbiotika -** neživé mikroorganismy nebo jejich složky

- **fágová terapie**

- **transplantace mikrobioty/fekální transplant**

Tělu vlastní prebiotika

- kojící matky produkují oligosaccharidy, které nejsou tráveny –
  - návnada pro pathogeny?
  - podpora žádoucích bakterií (schopných je trávit)

- vagina – glykogen

- střevní mukóza produkuje hlen (mucin)

Manipulace lidského mikrobiomu

- *Clostridium difficile* - faecal transplant (stool bank - OpenBiome)

- 4. století – čínská lékařská literatura – fekální transplant při otravách z potravy a silných průjmech

- beduíni – velbloudí trus při bakteriální dysentérii

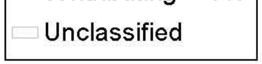
- ale napřed MUSÍME POZNAT mikrobiom, teprve pak můžeme pomýšlet na cílenou manipulaci

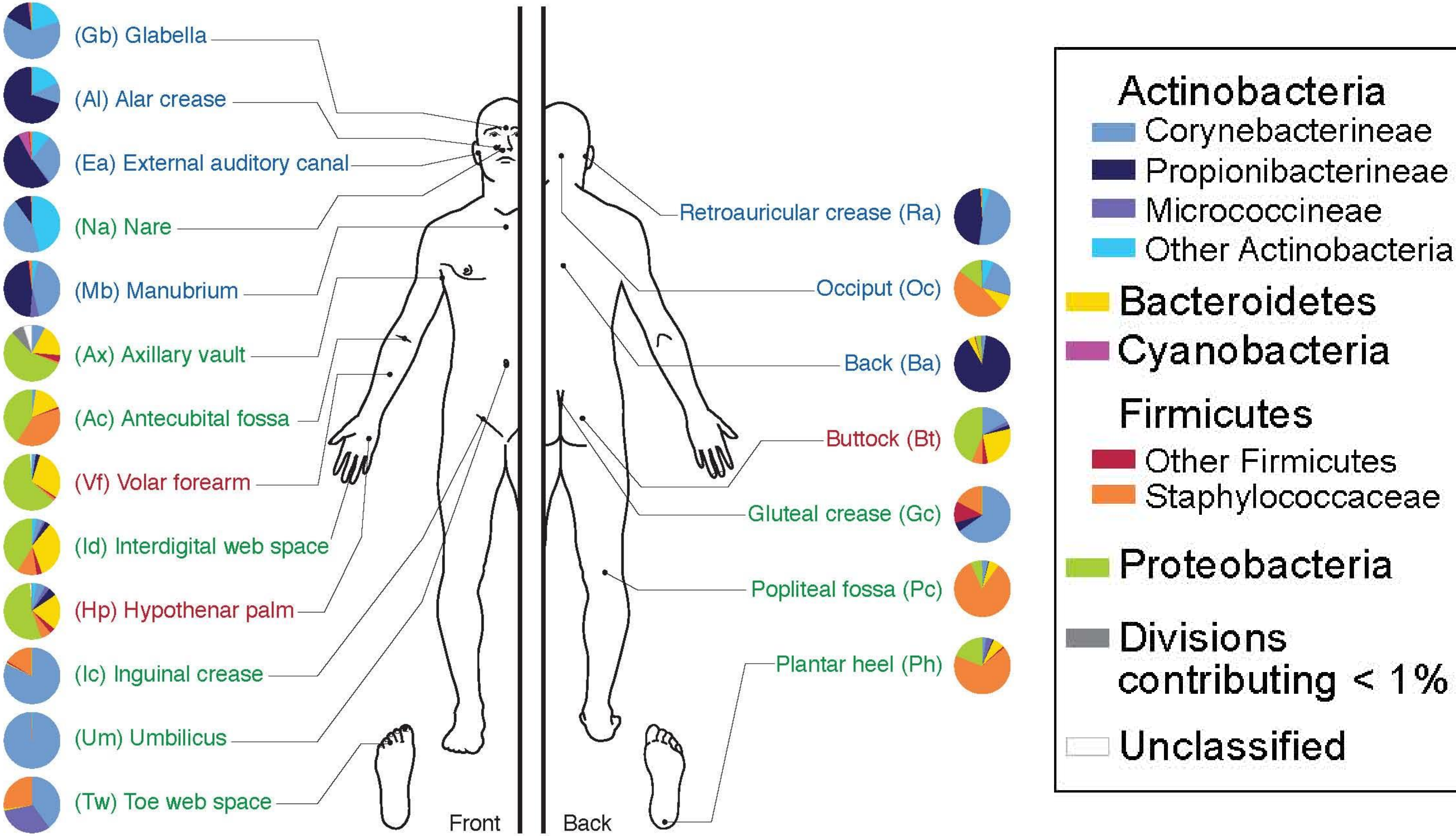
Human Microbiome Project

- zahájen 2008 – pětiletý projekt - rozpočet $115 million
- **(Human Genome Project –** zahájen 1990, dokončen 2003)
- vzorky flóry ústní dutiny, kůže, vagíny, zažívacího traktu a dýchací soustavy 300 zdravých jedinců

- význam změn lidského mikrobiomu pro zdraví a nemoc
- **ALE** – co bylo první?!?!?!?!
- zahájeno mnoho dalších (specializovaných) studií mikrobiomu:
  - American Gut Project, MetaHIT, MyMicrobes, Human Longevity, Earth Microbiome project, Human Food Project

- dramatické rozdíly mezi jedinci co se týká druhového složení
- **ALE** posuzováno podle funkce - velmi podobné
- mikrobiom každého jedince je v čase celkem stabilní
- hlavní problém v interpretaci výsledků – veřejné databáze


Unclassified


(Gb) Glabella
(Al) Alar crease
(Ea) External auditory canal
(Na) Nare
(Mb) Manubrium
(Ax) Axillary vault
(Ac) Antecubital fossa
(Vf) Volar forearm
(Id) Interdigital web space
(Hp) Hypothenar palm
(Ic) Inguinal crease
(Um) Umbilicus
(Tw) Toe web space
Front
Back
Retroauricular crease (Ra)
Occiput (Oc)
Back (Ba)
Buttock (Bt)
Gluteal crease (Gc)
Popliteal fossa (Pc)
Plantar heel (Ph)
Actinobacteria
Corynebacterineae
Propionibacterineae
Micrococcineae
Other Actinobacteria
Bacteroidetes
Cyanobacteria
Firmicutes
Other Firmicutes
Staphylococcaceae
Proteobacteria
Divisions contributing < 1%
Unclassified

Význam lidské mikrobioty

- do r. 2015 – publikováno kolem 19 000 článků (5,000 v r. 2015)
- většina ale popisných – identifikace
- zůstává otázkou jejich role ?
- jak spolupracují mezi sebou a s lidským hostitelem?
- lidská mikrobiota také viry, archaea, houby, jednobuněčná eukaryota...

- lidský genom -20 000-25 000 protein kódujících genů
- lidský mikrobiom - 2-20 miliónů protein kódujících genů
- všichni mikrobi kontinuálně vylučují (excrete/secrete) malé a velké molekuly a částice obsahující RNA, DNA, proteiny - komunikace se sousedy a hostitelem – mnoho z těchto molekul a částic může proniknout stěnou zažívacího traktu do krevního oběhu
- mikrobiom – rychlejší změny než lidský genome
    - rychlá odezva
- mikrobiom = sofistikovaný orgán (nebo soubor orgánů)

Máme všichni stejné mikroby ?

- **rozdíly: zažívací trakt, vagina (druhová i metabolická rozmanitost)**
- **podobnost: mikroflóra úst a kůže – změny v čase, ale méně variabilní u různých jedinců**

Pár slov závěrem

Mikrobiota a zdraví

- prenatální vývoj
- způsob porodu
- výživa během prvních měsíců (kojení…)
- následná výživa
- šetrné používání antibiotik
- hygiena
- životní styl

Problémy s probiotiky

- omezené vědecké důkazy
- primárně nejde o účinnost, ale o bezpečnost (neublížit)
- obecně neúčinné pro indikace onemocnění
- neúspěch při prosazení se, namnožení se (zvláště, jsou-li podána pozdě)
- neexistují žádné průmyslové standardy
- lékařská tvrzení nejsou povolena
- veřejnost s vymytým mozkem

Manipulace orální mikrobioty - probiotika

Významná role inhibičních látek produkovaných mikroby

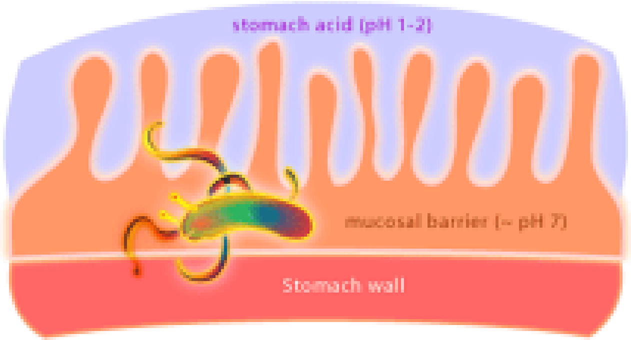
- bakteriociny - proteinové složení a úzkým spektrem účinnosti (dokonce mohou být letální i produkující bakterii – programmed cell death?
  - objeveny 1925 u kultuře *E. coli*, časté u bakterií
- BLIS - Bacteriocin-Like Inhibitory Substances
- RiPPs - ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides
- AMPs - antimicrobial peptides – malé peptidy s širším spektrem účinnosti

Bakteriociny

- relativně úzké spektrum aktivity, vysoká molekulární stabilita,
  a nízká antigenicita = zvýšený zájem vědecké komunity
- místo antibiotik aplikace personalizovaných koktejlových kombinací probiotik (omezení vzniku rezistence na antibiotika)
- bakteriociny mají také antivirovou aktivitu
- Mají potenciál reagovat i s eukaryotickými buňkami (nádorovými)
- Vliv i na revmatoidní artritidu

Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu

- věk, dieta, kulturní podmínky, užívání antibiotik, …
- ezophagus – žádné bakterie
- žaludek– pH - acid-tolerantní lactobacilli
  - *Helicobacter pylori* – žaludeční vředy, rakovina žaludku a dvanácterníku
  - urease – urea – ammonium
  - možná i pozitivní funkce
    - ochrana proti dětským průjmům a problémům jícnu (pálení žáhy a vážnější důsledky)



Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu – pok

- **tenké střevo** – vysoká průtoková rychlost - lactobacilli a *Enterococcus faecalis* - 10^5 - 10^7
- vzdálenější části (10^8/ml) – další druhy - *E. coli* a příbuzné bakterie plus *Bacteroides*
- trávení - převážně lidské enzymy, mikrobi – možná kompetice o esenciální živiny

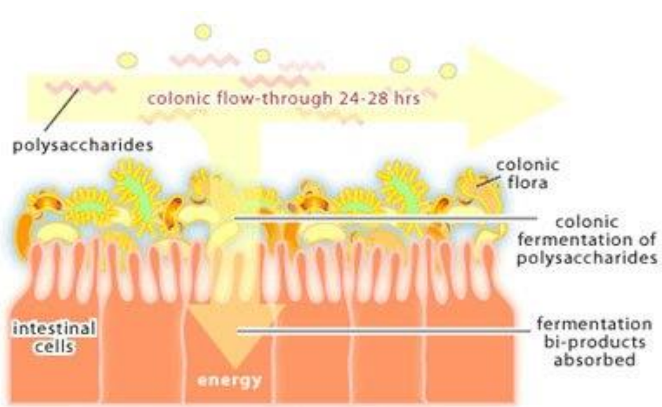
- **tlusté střevo** (colon) – mikrobi jako v exkrementech - 10^{11}/ml – 10^{13}
- bakterie – kolem 35-50% obsahu tlustého střeva – více jak 1 kg
- koliformní, enterokoci, klostridia a laktobacilli
- predominantní anaerobní *Bacteroides* a anaerobní bakterie mléčného kvašení *Bifidobacterium spp.* (*Bifidobacterium bifidum*)
- významné množství anaerobních methanogenů

Normální mikrobiota gastrointestinálního traktu – pok

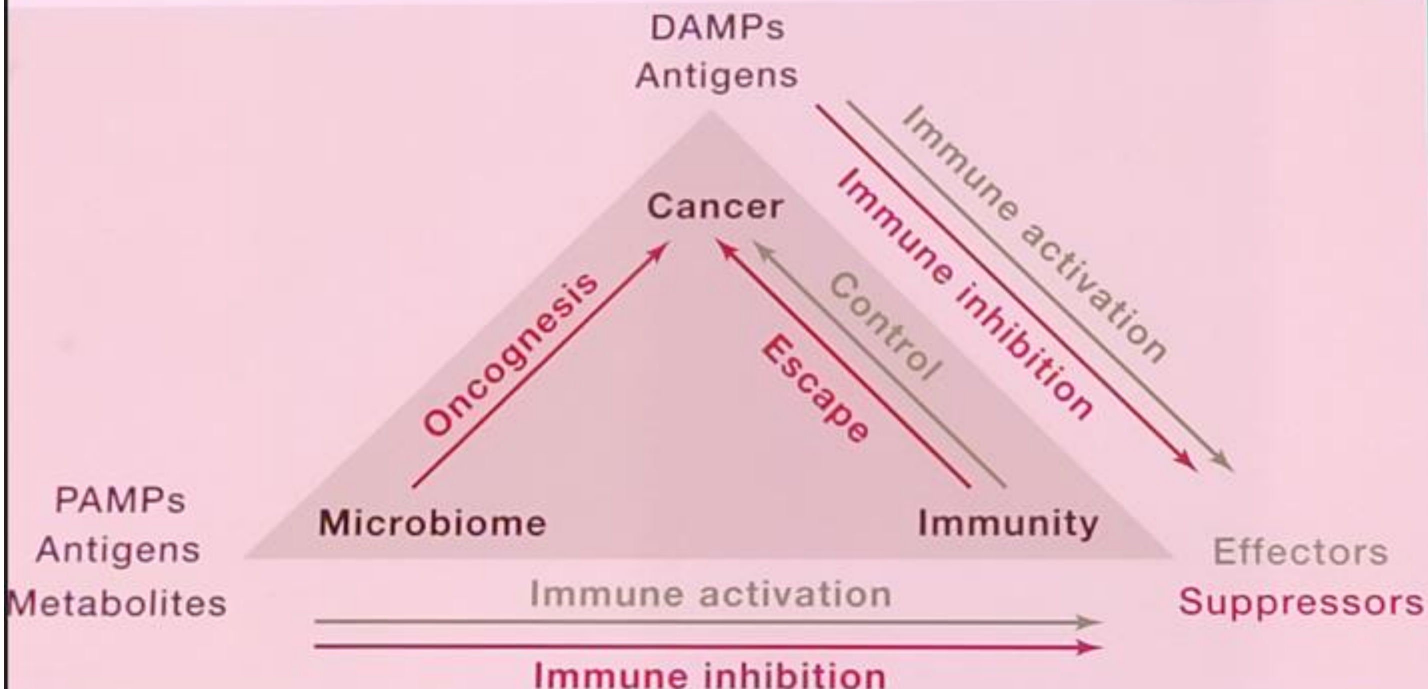
Úloha bakterií v GI traktu

- přispívají k výživě a trávení (polysacharidy – acetate, butyrate a propionate – zdroj uhlíku a energie pro buňky sliznice tl. střeva)
- ochrana proti infekci cizorodými mikroby
- produkce vitamínů
- stimulace vývoje a aktivity imunologických tkání

- produkce karcinogenních metabolitů (colon cancer)
- změny ve složení GI flory (špatná výživa, antibiotika)
  - posun populací a kolonizace cizorodými bakteriemi
  - gastrointestinalní nemoci



Bacteria modulate the immune system and affect tumor growth



FMT z lidských anti-PD1 respondérů snižuje růst nádoru

Preklinické myší modely naznačují, že střevní mikrobiom moduluje odpověď nádoru na imunoterapii blokádou kontrolního bodu; toto však nebylo dobře charakterizováno u lidských pacientů s rakovinou. Imunitní profilování naznačovalo zvýšenou systémovou a protinádorovou imunitu u respondérů s příznivým střevním mikrobiomem, stejně jako u bezmikrobních myší, které dostávaly fekální transplantáty od respondérů.
Společně mají tato data důležité důsledky pro léčbu pacientů s melanomem pomocí inhibitorů imunitního kontrolního bodu.

Science . 2018 Jan 5;359(6371):97-103. doi: 10.1126/science.aan4236. Epub 2017 Nov 2.
Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients

Checkpoint inhibitor

Checkpoint inhibitor therapy is a form of cancer immunotherapy. The therapy targets immune checkpoints, key regulators of the immune system that when stimulated can dampen the immune response to an immunologic stimulus. Some cancers can protect themselves from attack by stimulating immune checkpoint targets.

Bacteria as cancer therapy?

- ✓ Potentially yes
- ✓ Fecal microbiota transplantation works in mouse models, and likely as well in human cancer patients
- ✓ Bacteria enhance efficacy of ICI therapy: early clinical trials ongoing
- ✓ Metabolites enhance ICI efficacy in mouse models

➡ Can bacteria be used as stand-alone therapy / not in combination with ICIs as anti-cancer therapy?

Conclusions: Bacteria as cancer therapy

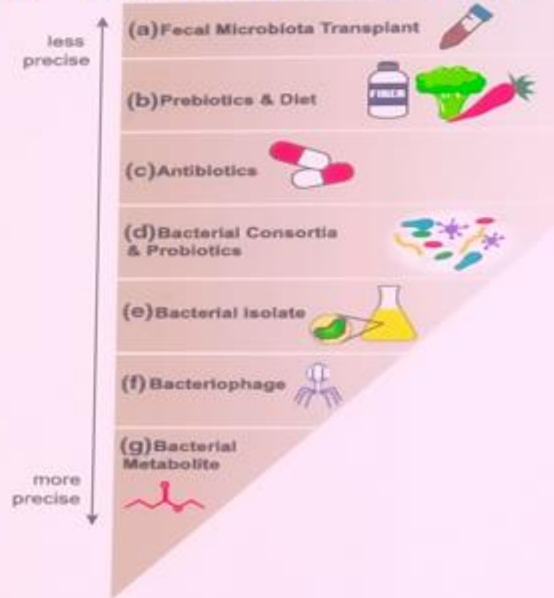
- ✓ The microbiome modulates anti-tumor immune responses
- ✓ Bacteria can serve as predictive biomarkers for therapy response and enhance ICI efficacy
- ✓ Early clinical trials have to prove the efficacy of bacteria as cancer therapy in humans
- ✓ Our own approach is novel: bacteria/bacterial metabolites exert anti-tumor efficacy independent from ICI

Faecalibacterim prausnitzii : a unique member of the human gut microbiota

- Strictly anaerobes bacterium (Firmicutes phylum)
- Member of the phylogenetic core
- Represent by itself ~5% of the normal microbiota
- High levels associated with health / Decreased in diseases (IBD)
- Exhibits immunomodulatory effects

➔ Explore deeper this signal

The issue or reproducibility

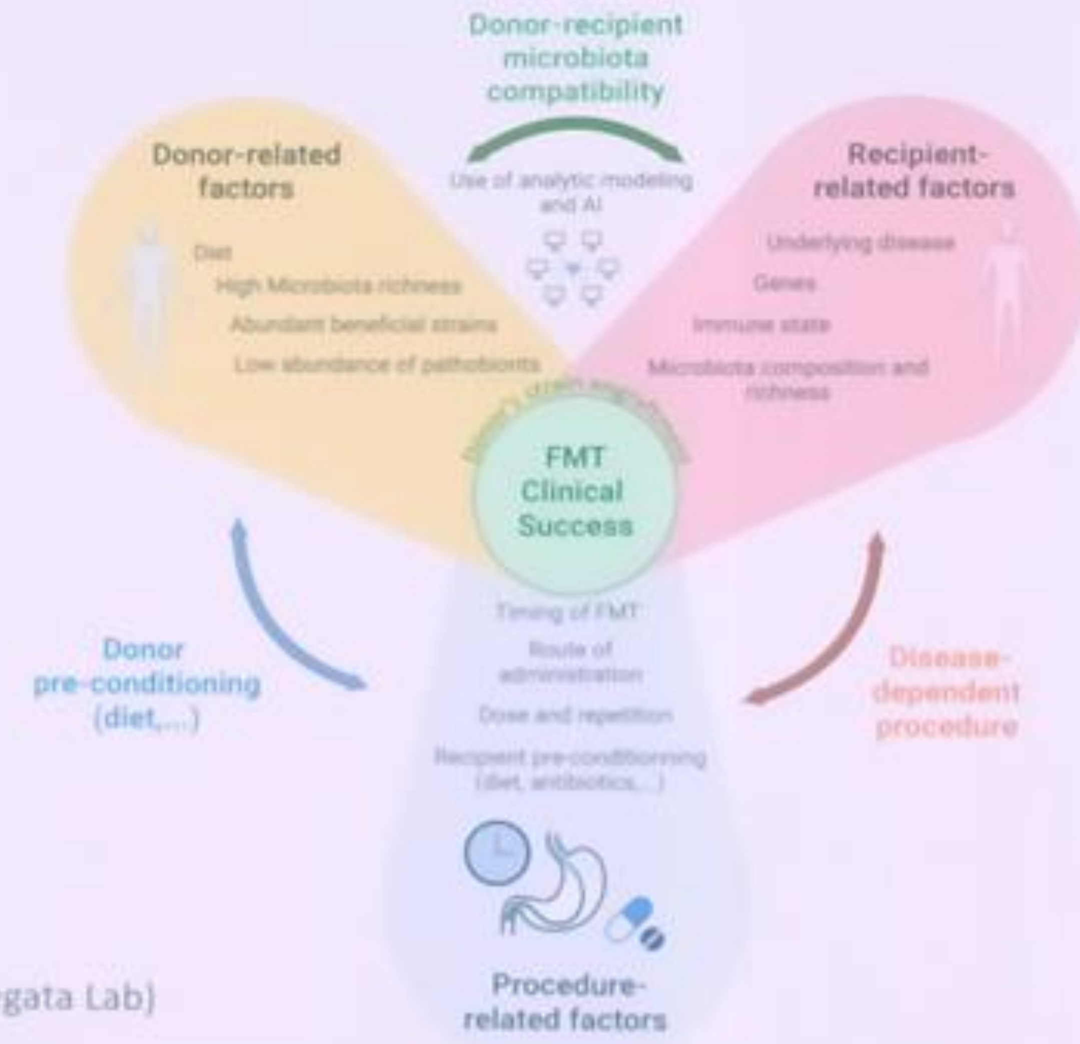


Future microbiome therapeutics (FMT 2.0) are expected to allow a more precise and reproducible therapeutic approach

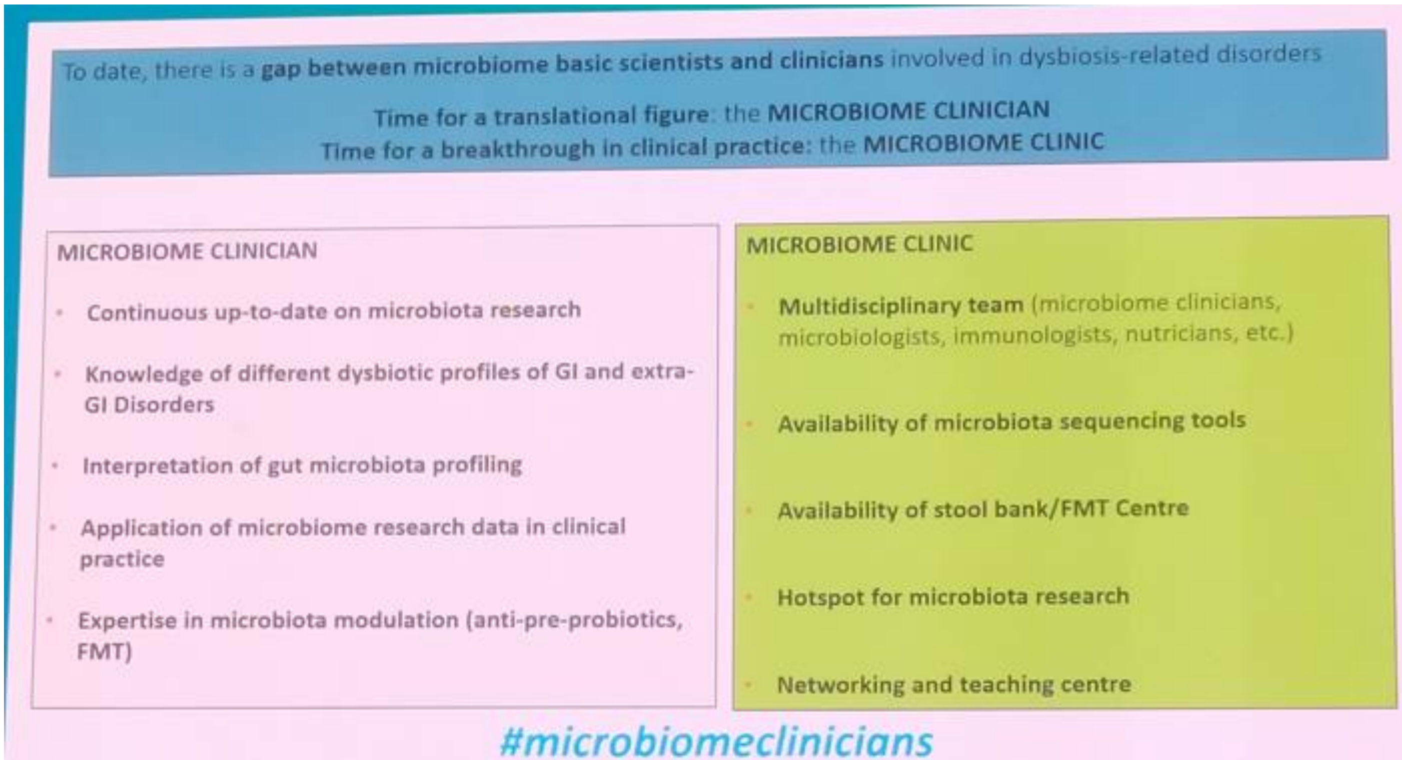
Fessler *et al* 2019 - *J Immunother Cancer*

CONCLUSIONS

The landscape of factors influencing FMT efficacy



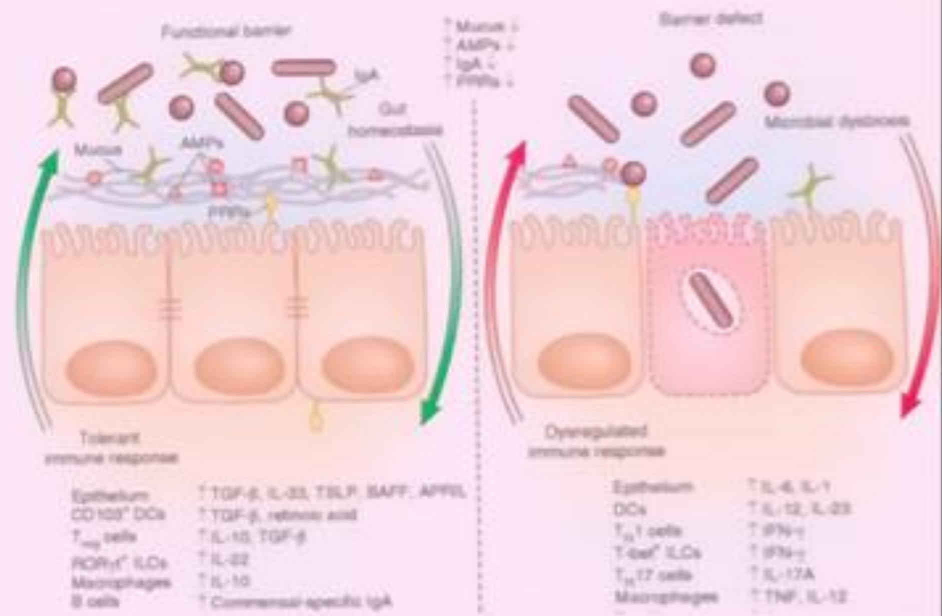
Porcari et al – Under review (with Sokol Lab & Segata Lab)


To date, there is a gap between microbiome basic scientists and clinicians involved in dysbiosis-related disorders
Time for a translational figure: the MICROBIOME CLINICIAN
Time for a breakthrough in clinical practice: the MICROBIOME CLINIC
MICROBIOME CLINICIAN
Continuous up-to-date on microbiota research
Knowledge of different dysbiotic profiles of GI and extra-GI Disorders
Interpretation of gut microbiota profiling
Application of microbiome research data in clinical practice
Expertise in microbiota modulation (anti-pre-probiotics, FMT)
MICROBIOME CLINIC
Multidisciplinary team (microbiome clinicians, microbiologists, immunologists, nutricians, etc.)
Availability of microbiota sequencing tools
Availability of stool bank/FMT Centre
Hotspot for microbiota research
Networking and teaching centre
#microbiomeclinicians

Key Microbial-Mediated Metabolites can Impact Gut Epithelial Integrity and Inflammatory Pathways

Microbial metabolites promote anti-inflammatory responses

- **SCFA**
  - Enhance mucus production and tight junctions
  - Act on PPAR-γ to down-regulate iNOS
- **Tryptophan metabolites**
  - Activate immune system through aryl hydrocarbon receptor (AHR)
  - Improve barrier function by promoting mucus production
- **Secondary Bile Acids**
  - Signal FXR; modulates NFkB to regulate cytokine production
  - Signal TGR5; modulates cAMP mediated pathways to suppress inflammatory responses



Brown et al. *Nat Immunology* 20

Strategies in Improving Outcomes of FMT in UC

- 1. highly effective "super" donor
- 2. single vs multiple administrations of FMT
- 3. pre-conditioning antibiotics
- 4. diet priming to FMT donors
- 5. diet combination-therapy with FMT
- 6. defined consortia (cultured, known strains, quality-controlled)

Conclusions

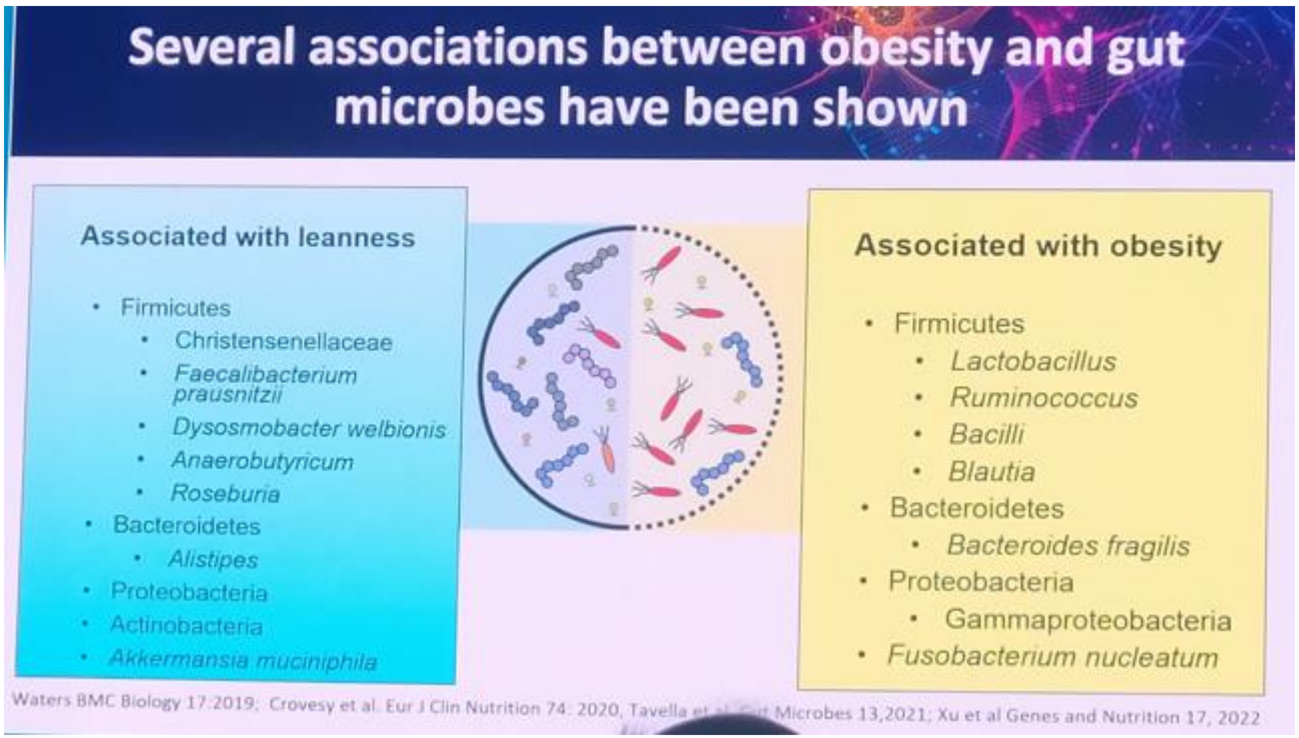
- FMT: rapid microbial changes, sustained for months
  - fresh / frozen; route – *similar results*
  - engraftment, ↑metabolites eg SCFA – *efficacy biomarkers*
  - multi- FMT and/ or anti-inflammatory diet – *may* sustain benefits
  - recipient: higher alpha-diversity, lower inflammation – *may* respond better
  - donor "evenness"; taxonomic / metagenome signatures – *may improve* efficacy
  - antibiotic priming (eg vs *Fusobacterium* spp) – *probably improves* efficacy
  - pre-donor conditioning diet: more data (donors already on a good diet?)
  - prediction / personal modelling – *may* match donor vs recipient
- further data: defined consortia; diet-only (eg UC Elimination Diet)
  - virome, mycobiome, Archea


Causes of obesity and MetS are multifactorial
Advances in technology
Lack of physical activity
Medications
Microbiome
High caloric and processed foods
Decrease in Fiber
Stress and lifestyle factors
Genetics and epigenetics
Obesity and Metabolic Disorders

There is extensive evidence linking gut microbiota to host metabolism in animal models

- Significant alterations in host metabolism in germ-free mice
- Germ-free mice resistant to diet-induced obesity
- Fecal transplants from human twin pairs discordant for obesity can transfer phenotype
- Selected microbial strains can induce metabolic dysfunction while others protect against disease

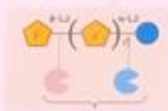
Backhed et al. PNAS 2004;2007, Turnbaugh et al Nature 2006, 2009; Cani et al Diabetes 2008;Ley et al 2006, Ridaura et al Science 2013; Michaeil et al 2015;Goodrich et al 2014 Yuan et al. Cell Metabolism 30:2019;LeRoy et al. Gut 71:2022


Several associations between obesity and gut microbes have been shown
Associated with leanness
• Firmicutes
• Christensenellaceae
• Faecalibacterium prausnitzii
• Dysosmobacter welbionis
• Anaerobutyricum
• Roseburia
• Bacteroidetes
• Alistipes
• Proteobacteria
• Actinobacteria
• Akkermansia muciniphila
Associated with obesity
• Firmicutes
• Lactobacillus
• Ruminococcus
• Bacilli
• Blautia
• Bacteroidetes
• Bacteroides fragilis
• Proteobacteria
• Gammaproteobacteria
• Fusobacterium nucleatum
Waters BMC Biology 17:2019; Crovesy et al. Eur J Clin Nutrition 74: 2020, Tavella
Microbes 13,2021; Xu et al Genes and Nutrition 17, 2022

What is fiber?

Why do we need fiber in our diet?

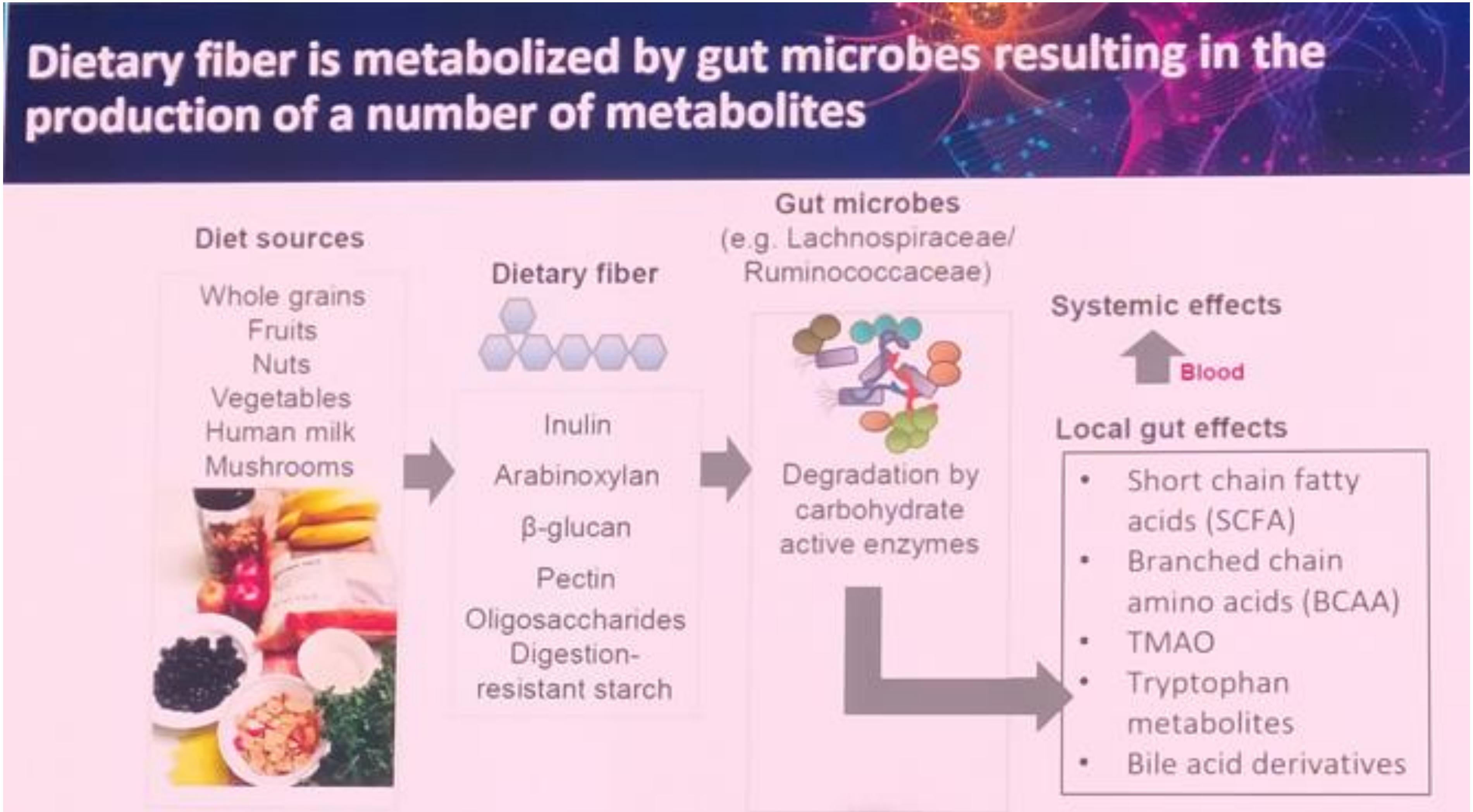
Xyloglucan



Fructooligosaccharide (FOS)

Non-digestible carbohydrates that are utilized by specific intestinal microbes

β-1,3-glucan


Dietary fiber is metabolized by gut microbes resulting in the production of a number of metabolites
Diet sources
Whole grains
Fruits
Nuts
Vegetables
Human milk
Mushrooms
Dietary fiber
Inulin
Arabinoxylan
β-glucan
Pectin
Oligosaccharides
Digestion-resistant starch
Gut microbes
(e.g. Lachnospiraceae/ Ruminococcaceae)
Degradation by carbohydrate active enzymes
Systemic effects
Blood
Local gut effects
• Short chain fatty acids (SCFA)
• Branched chain amino acids (BCAA)
• TMAO
• Tryptophan metabolites
• Bile acid derivatives


Can FMT help with weight loss?
Generally, no.....

Challenges in using dietary and microbiome-based therapies to treat metabolic syndrome

Conflicting data in literature

- Inclusion criteria
- Baseline insulin resistance
- Metabolic background of donors
- Investigation techniques

Intestinal importance

- Small intestine vs colon
- What part of the intestinal microbiota plays the most important role in metabolism?

Individual factors

- Stomach acid
- Intestinal transit time
- Dietary intake
- Existing microbiota

Mode of administration

- Capsule
- Fresh or frozen FMT via duodenal or colonic infusion

Beyond bacteria

- Composition of microbiota also includes viruses, fungi, human cells, and metabolites

Nieuwdorp and Madsen Gastroenterology 2021

Key Takeaways

- Therapy aimed at microbiota-linked pathways has significant potential to improve metabolic health and obesity
- Relevant strategies include
  - Using dietary strategies to enhance and maintain effects of FMT
  - Using microbial components to stimulate GLP-1 secretion and enhance gut barrier function
  - Combining different microbial strains with specific substrates to enhance cross-feeding and restore a healthy gut ecology

SYSTEMATIC REVIEW ARTICLE

Front. Psychiatry, 11 February 2019 | https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00034

Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression

Stephanie G. Cheung, Ariel R. Goldenthal, Anne-Catrin Uhlemann, J. John Mann, Jeffrey M. Miller and M. Elizabeth Sublette

Conclusions: No consensus has emerged from existing human studies of depression and gut microbiome concerning which bacterial taxa are most relevant to depression

TAKE HOME MESSAGE

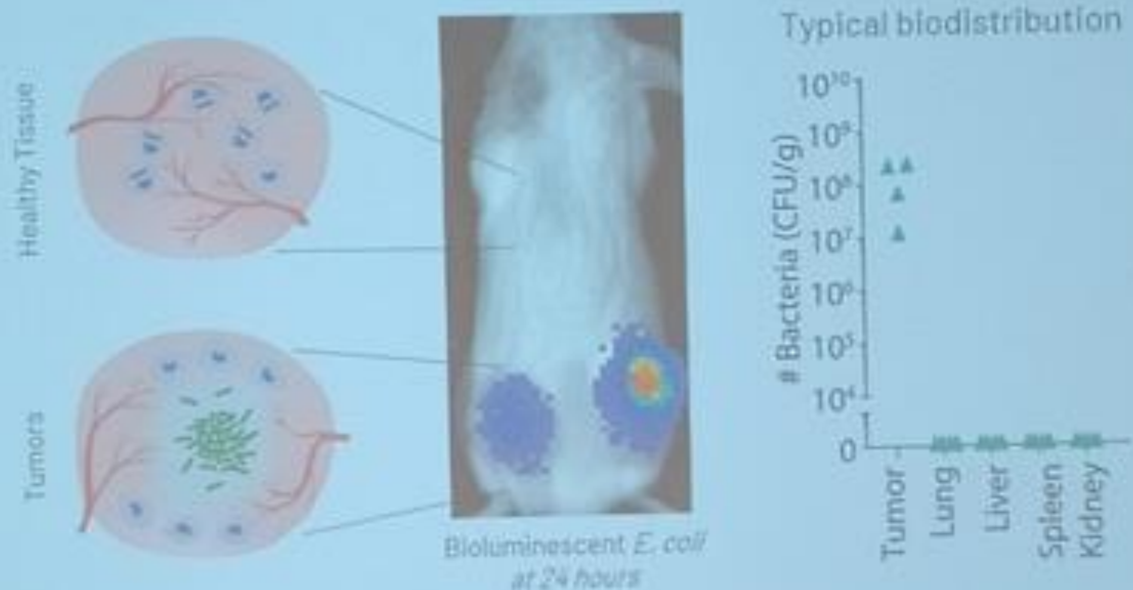
- Disturbance of the gut microbiota at an early age can predispose to development of psychiatric disorders
- There are no clear differences in microbiota profiles of patients with psychiatric disorders
- While individual studies suggest that probiotics can improve psychiatric symptoms (anxiety and depression), the overall evidence is rather weak
- Additional studies with higher number of subjects, of comparable design and using the same probiotics, are needed

In 1868, W. Busch serendipitously observed that bacteria have an effect on growth of tumors

- Found 47 cases with positive correlation of bacteria infection with tumor regression
- Injected bacteria and "Coley's toxins" into cancer patients, with specific success in inoperable bone and soft tissue sarcomas
- Father of "immunotherapy"
- Widespread lack of availability of antibiotics, beginnings of radiation and chemotherapy, eventually lead to demise of the field

1890-1936: William B. Coley @ New York Cancer Hospital

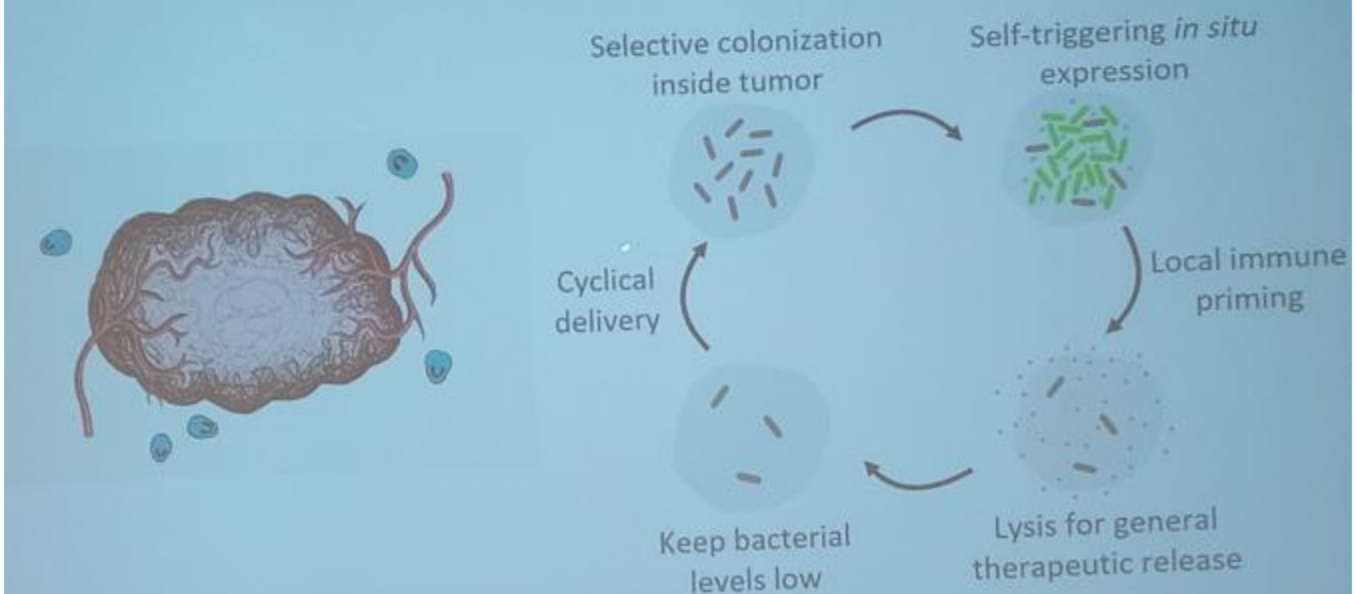
Bacteria selectively grow in tumor environments



- Intravenously injected bacteria enter the tumors > 1 mm³ via vasculature
- *Selective amplification due to low immune surveillance in tumor core*
- Hypoxic, low-pH, and necrotic tissue amenable to bacteria enrichment – Bacteria such as *S. typhimurium, E. coli, C. novyi, Lactobacilli, Bifidobacterium*
- Colonizes all solid tumor types tested – *independent of genetics*

Forbes *et al., Nature Reviews Cancer* (2010)
Zhou *et al. Nature Reviews Cancer* (2018)

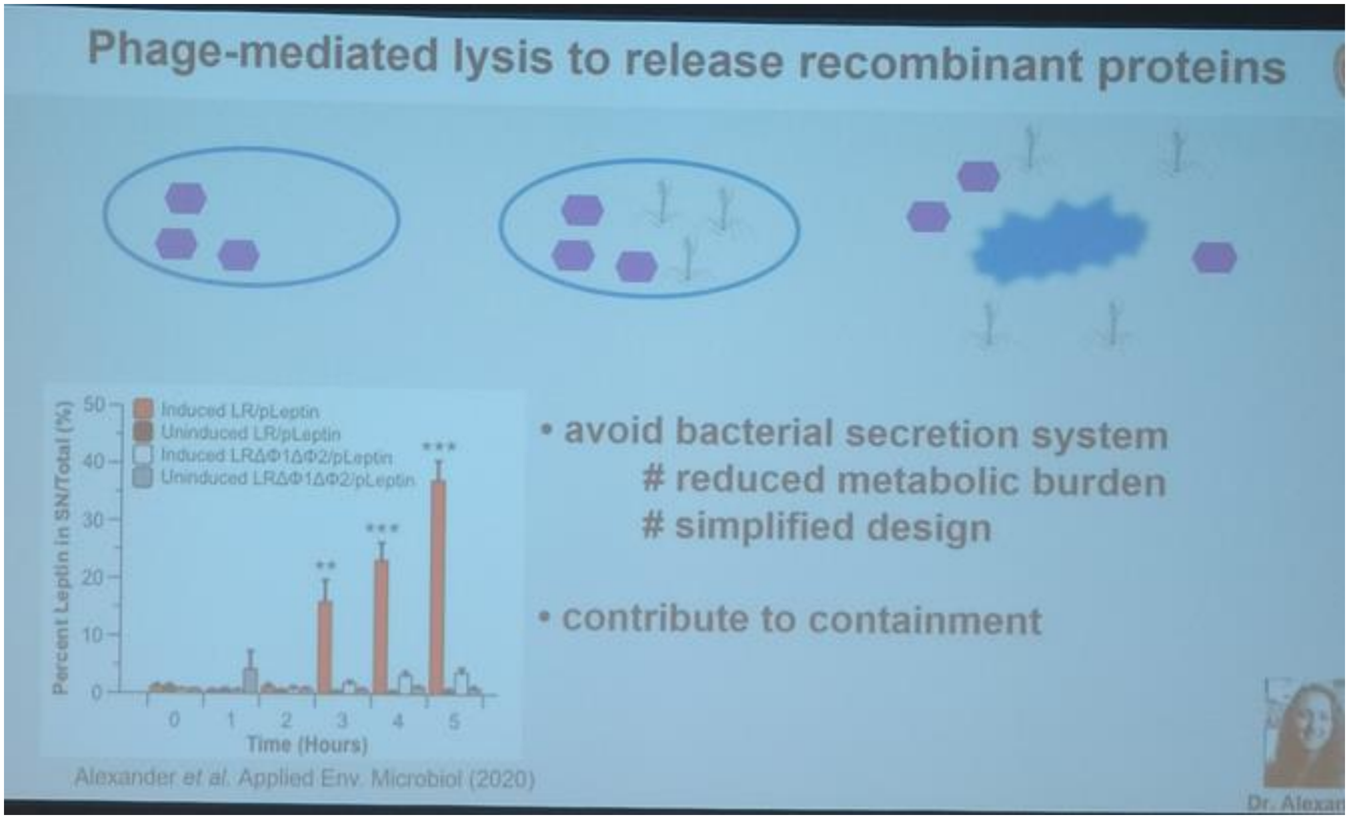
SLC probiotics for on-site production and delivery of therapeutics

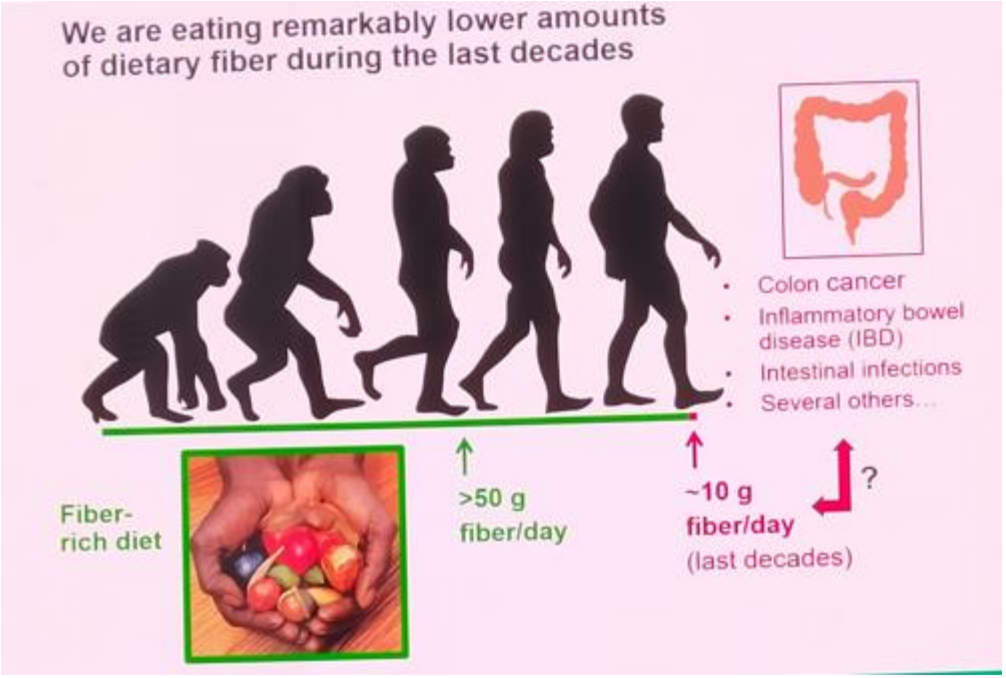


Delivery Methods

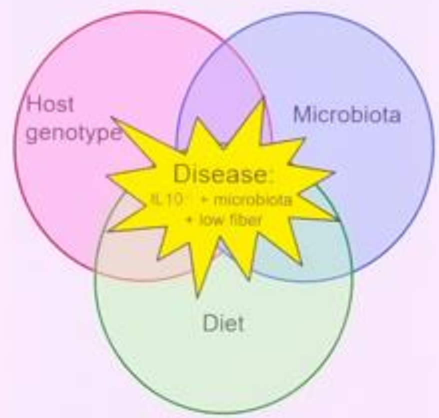
Delivery	Pros	Cons
Intravenous	Accepted delivery platform; straightforward implementation; ease of GMP production	Penetration to human tumors may be problematic
Intratumoral	Direct colonization of tumors; potential for single dose treatment	Tumor access; cost
Oral	Probiotic therapy would be revolutionary; Daily dosing; potential for prophylactic therapies	Novelty creates additional regulatory and POC challenges; Penetration potentially restricted to certain tumor types

We use immunocompetent, syngeneic models, and deliver bacteria to established tumors.


Phage-mediated lysis to release recombinant proteins
Percent Leptin in SN/Total (%)
Induced LR/pLeptin
Uninduced LR/pLeptin
Induced LRΔΦ1ΔΦ2/pLeptin
Uninduced LRΔΦ1ΔΦ2/pLeptin
Time (Hours)
Alexander et al. Applied Env. Microbiol (2020)
• avoid bacterial secretion system
reduced metabolic burden
simplified design
• contribute to containment

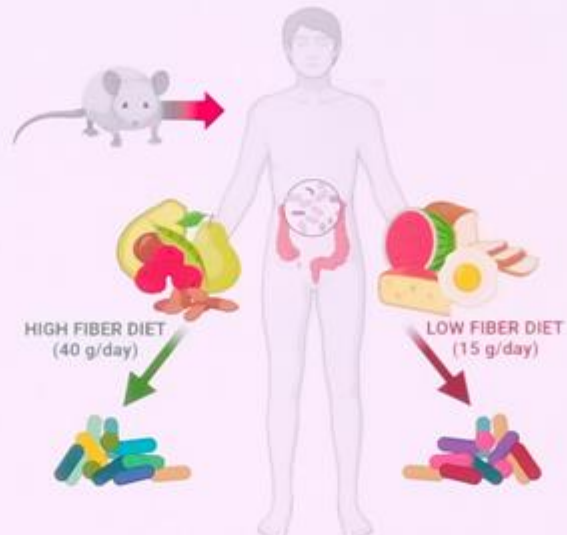

We are eating remarkably lower amounts of dietary fiber during the last decades
Colon cancer
Inflammatory bowel disease (IBD)
Intestinal infections
Several others…
Fiber-rich diet
>50 g fiber/day
~10 g fiber/day (last decades)
?

Combined low dietary fiber and mucin-degrading gut bacteria cause lethal colitis in genetically susceptible mice



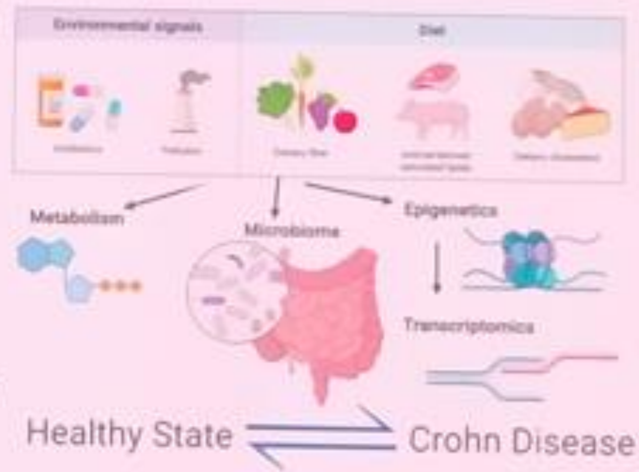
Summary of findings

- Microbial response to fiber deprivation in mice is highly translatable to humans
- Direct enzymatic assays suggest increase in mucin-targeting activities on low-fiber diet
- Uncultured microbes represent important knowledge gap

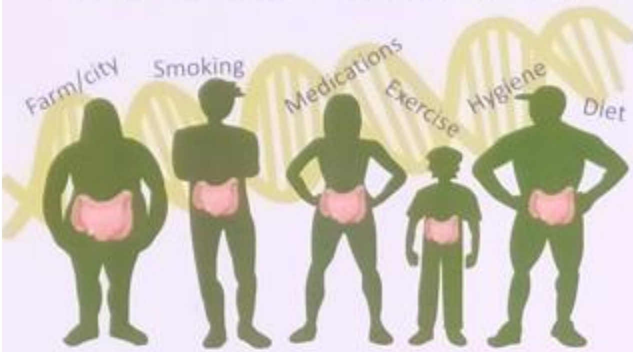


Conclusions

- Ileal transcriptomics in CD highlight innate epithelial inflammation and immune induction, with reduction in metabolic epithelial functions
- Diet-linked fecal metabolites associate with host epithelial metabolic functions, while the microbe-linked metabolites associate with the host immune response
- Fecal metabolomics interactions with the microbiome and the diet can highlight specific CD-pathogenic pathways
- Dietary interactions with **host transcriptomics and microbiome can help direct dietary recommendations** (after additional validation) - coffee and manganese consumption in addition to vitamin D
- Fecal metabolomics interactions with **host transcriptomics and the microbiome** prioritize potential beneficial small molecules/metabolites interventions for testing in preclinical models



People are different



99% similar genome
30% gut bacteria

- The system can be **redirected** to prevent, diagnose, treat pathologic conditions
- **Childhood** is the most dynamic period and there is a "window of opportunity" to most efectively redirect the system

- Need large and informative human cohorts
- Need models, interventions, testing

There are many ways to intervene - but need to know how (prioritize, model, and test the directionality and mechanism)

"Dysbiosis" extend to altered bacterial B Vitamin metabolism

Adapted from Vitamin and Mineral requirement in human nutrition - WHO

Vitamin B5 (Pantothenic acid):
✓ Fatty acid metabolism
✗ Fatigue, sleep disturbances, nausea

Vitamin B1 (Thiamine):
✓ Metabolism of carbohydrates and BCAA
✗ Beriberi, polyneuritis

Vitamin B6 (Pyroxidin):
✓ Metabolism of amino acids, glycogen
✗ Peripheral neuropathy, glossitis

Vitamin B2 (Riboflavin):
✓ Involved in many oxidation and reduction reactions
✗ Dermatitis, angular stomatitis

Vitamin B7/8 (Biotin):
✓ Metabolism of amino acids, carbohydrates
✗ Fatigue, depression, alopecia, muscular pain

Vitamin B3 (Niacin):
✓ Energy release and nervous system maintenance
✗ Dermatitis, dementia

Vitamin B9 (Folic acid):
✓ Role in genetic material and amino acid production
✗ Anemia, digestive and neurological disorders

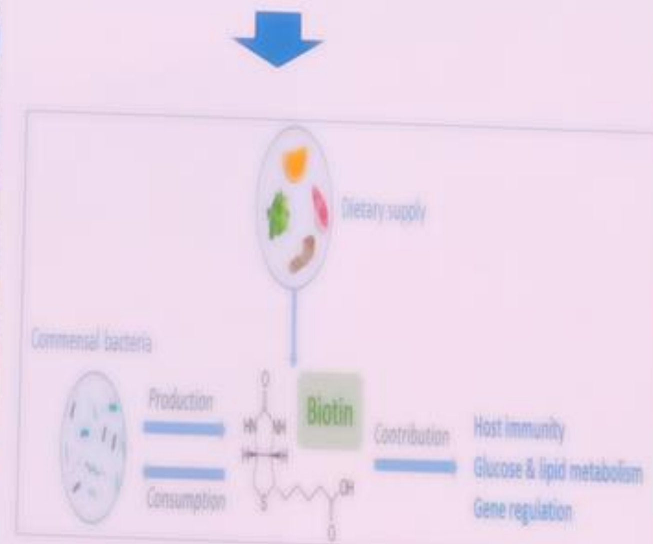
Vitamin B12 (Cobalamin):
✓ Role in DNA production and brain function
✗ Fatigue, anemia, weight loss, weakness

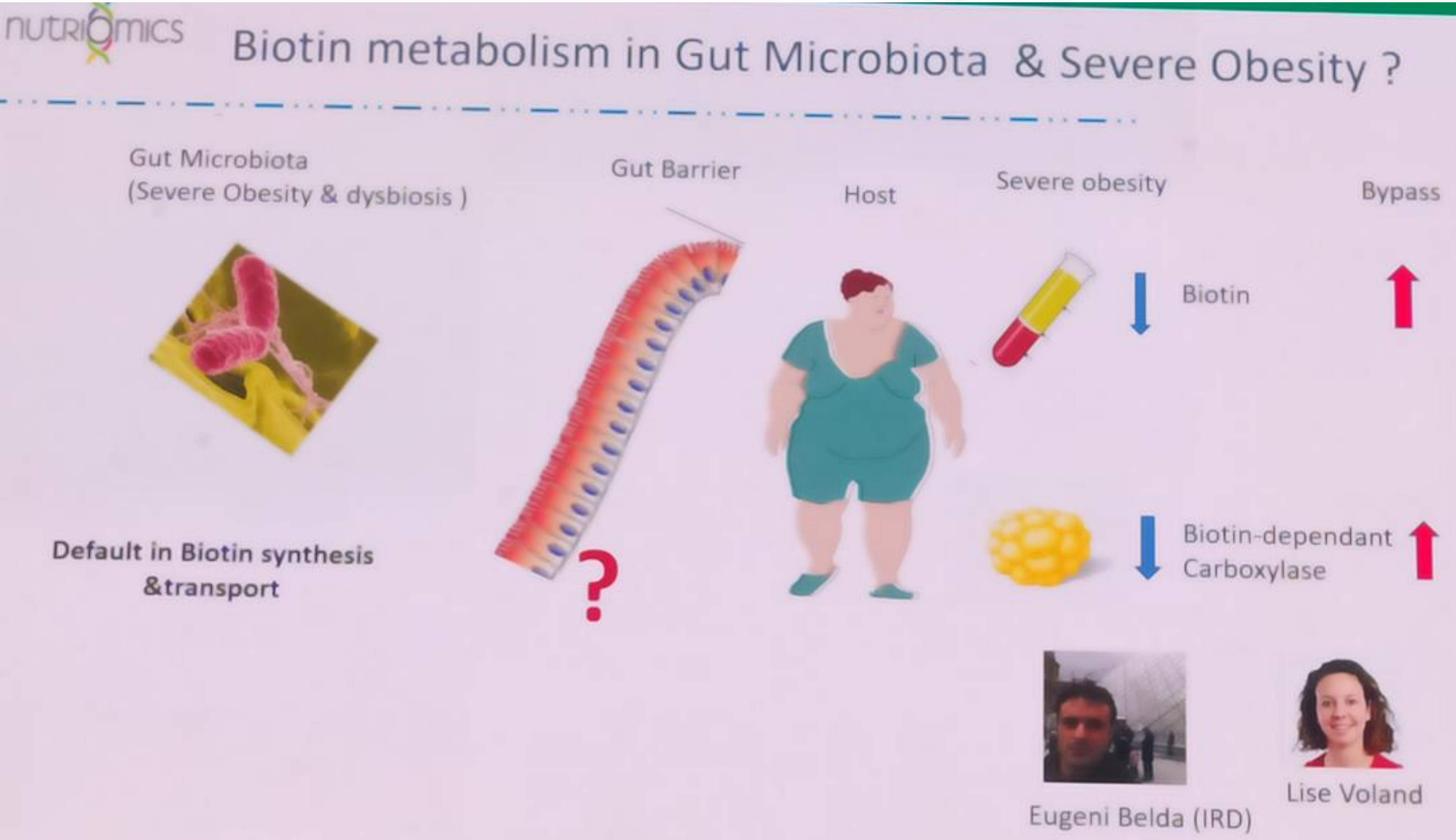
OBESITY Reviews

OBESITY/NUTRITION

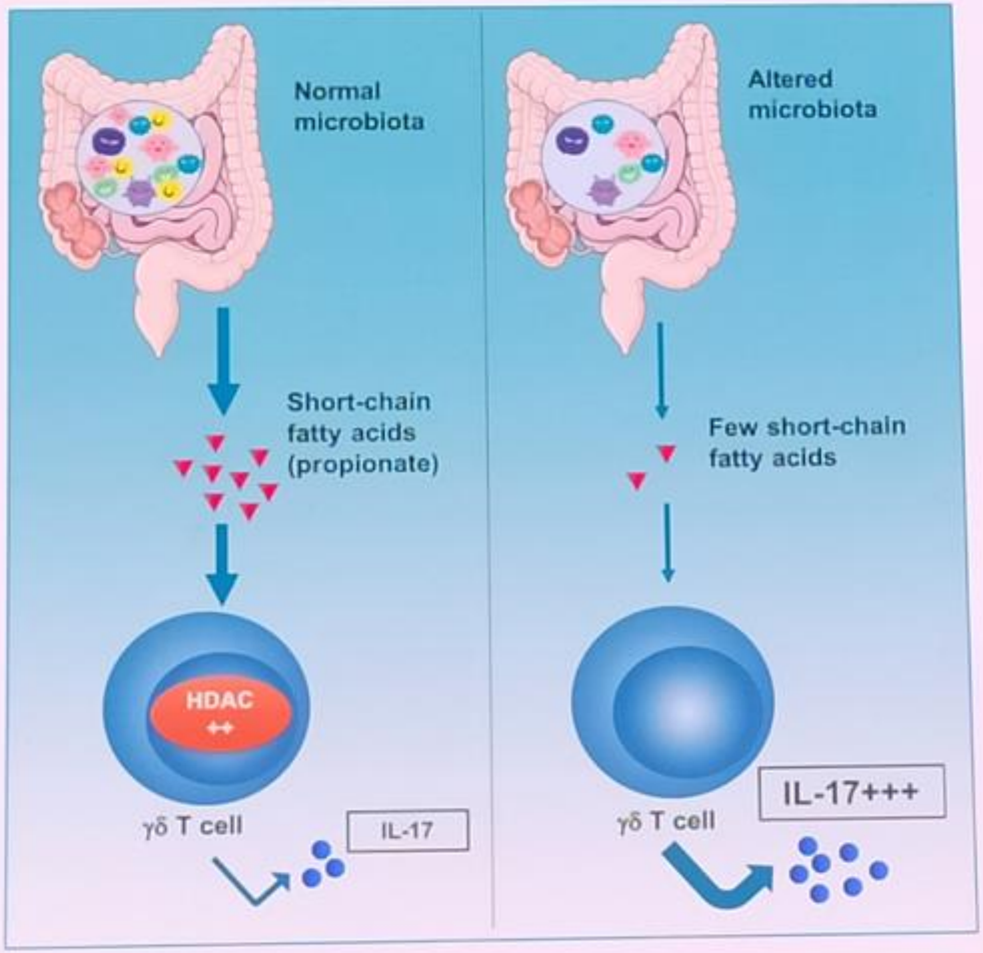
Gut microbiota and vitamin status in persons with obesity: A key interplay

First published: 12 November 2021




nutriomics
Biotin metabolism in Gut Microbiota & Severe Obesity ?
Gut Microbiota
(Severe Obesity & dysbiosis)
Gut Barrier
Host
Severe obesity
Bypass
Biotin
Biotin-dependant
Carboxylase
Default in Biotin synthesis
&transport
?
Eugeni Belda (IRD)
Lise Voland

Conclusion



Dupraz et al.
Cell Reports 2021