

Human Microbiome



Maido Remm

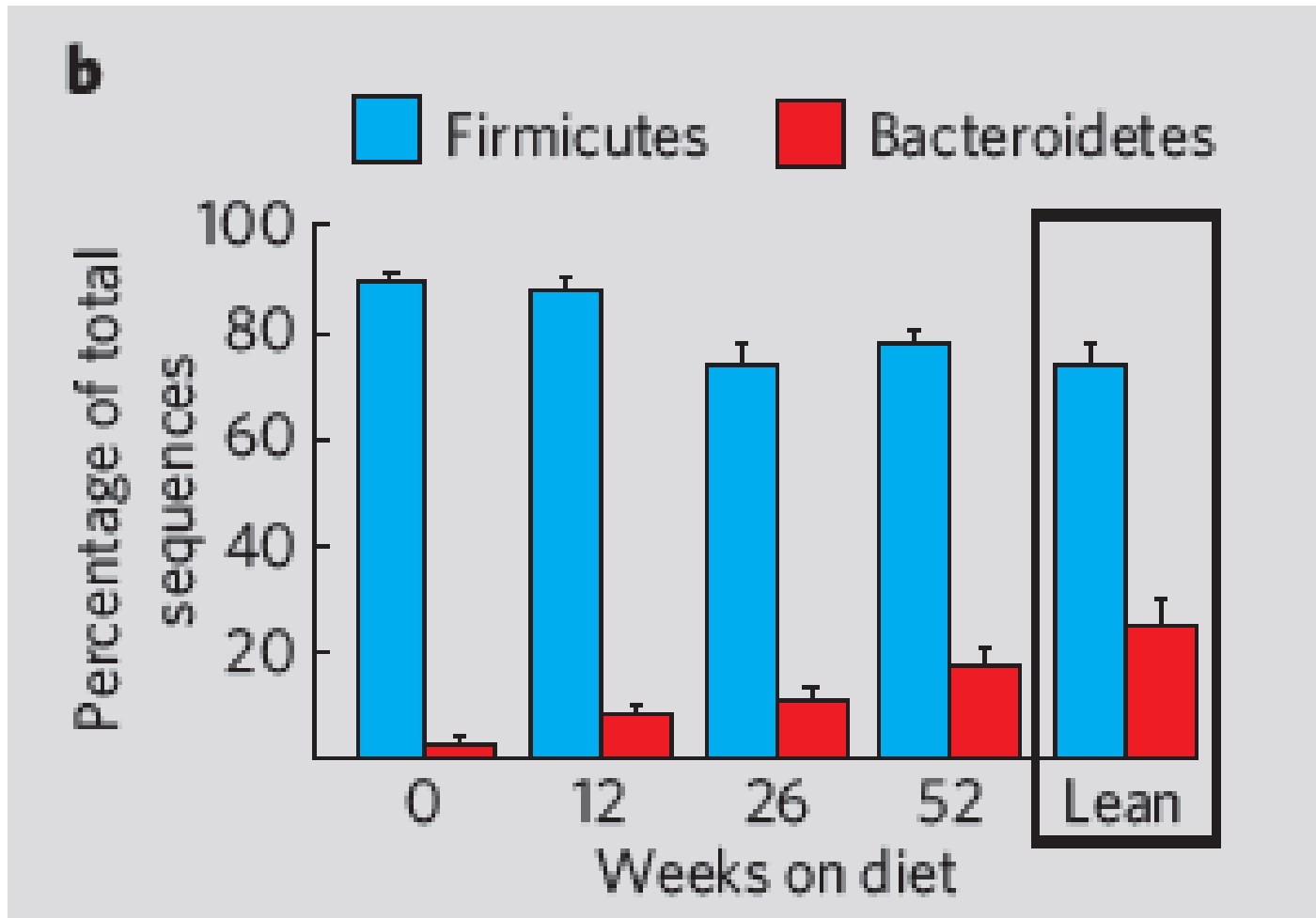
Journal Club
16.03.2010

Turnbaugh et al. Nature 2009

A core gut microbiome in obese and lean twins.

- Inimeste kõhus elab palju erinevaid bakteriliike. Inimese kehas on vaid iga kümnes rakk inimese enda oma (10^{13} inimese rakku vs 10^{14} bakterirakku)
- Inimesi ja hiiri uurides on leitud, et bakteriliikide arv ja koostis sõltub inimese kehakaalust. Paksematel inimestel on baktereid rohkem ja liigirikkus väiksem.
- Inimeste kõhnenemisel liigirikkus taastub.

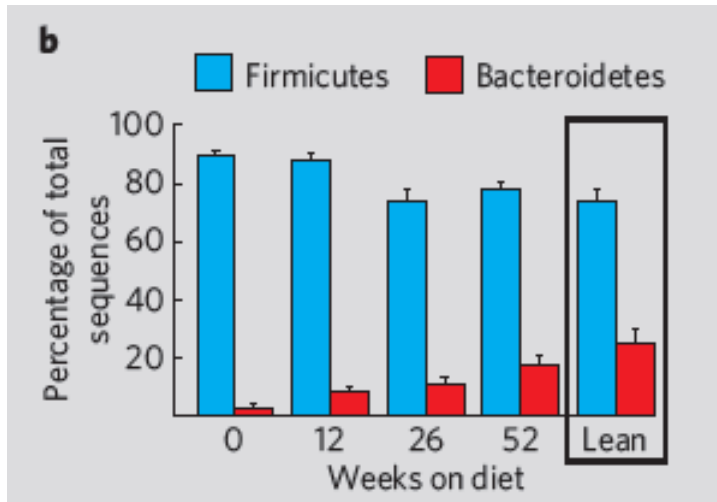
Paksematel inimestel on vaesem mikrofloora



Ley et al. Nature 2006

Human gut microbes associated with obesity.

Paksematel inimestel on vaesem mikrofloora



Hõimkond *Firmicutes* - sisaldab palju erinevaid perekondi (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Heliobacterium*, *Streptococcus*)

Hõimkond *Bacteroidetes* - peamine perekond on *Bacterium sp.*

Hõimkond *Actinobacteria* - näiteks *Bifidobacterium*

Turnbaugh et al. Nature 2009

A core gut microbiome in obese and lean twins.

Käesolevas artiklis küsiti:

1. Kui sarnane on bakterikooslus samas perekonnas elavates inimestes (ema-laps võrdlus)? Kui palju on soole bakterikooslus määratud geenide poolt (ühemunaraku ja kahemunaraku kaksikute võrdlus)?
2. Mille poolest erineb tüsedate inimeste mikrofloora kõhnade inimeste mikrofloorast?
3. Kas on olemas kindlad püsiliigid, kes elavad kõigis inimeste sooltes ("core microbiome")?

Turnbaugh et al. Nature 2009

A core gut microbiome in obese and lean twins.

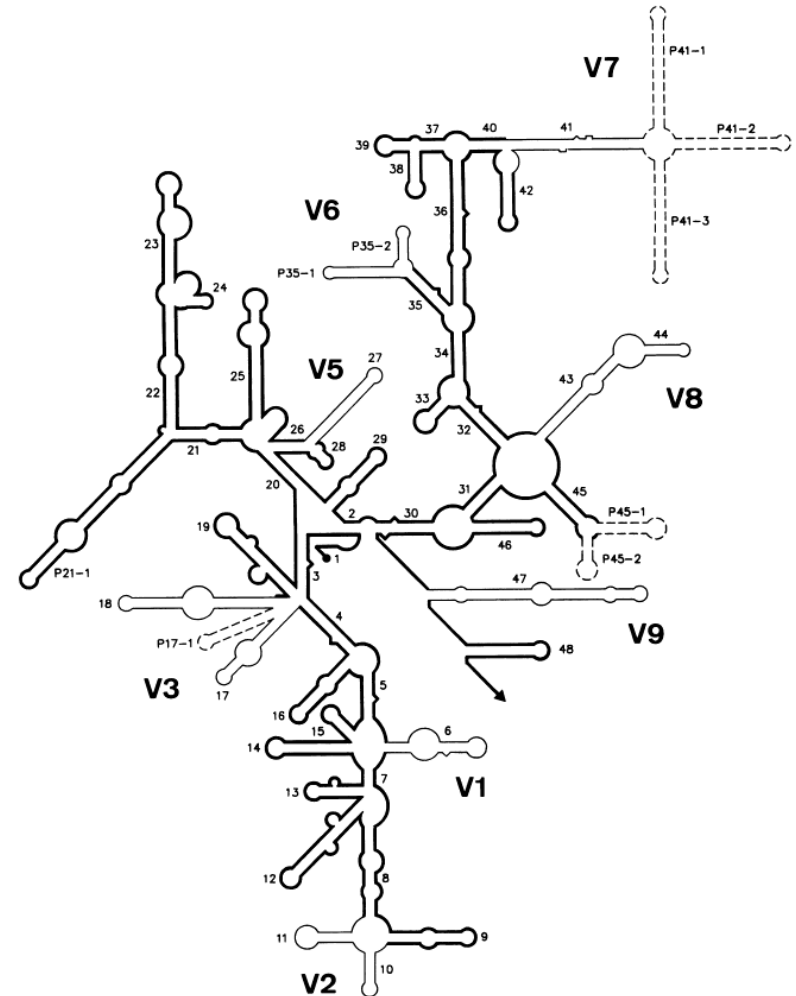
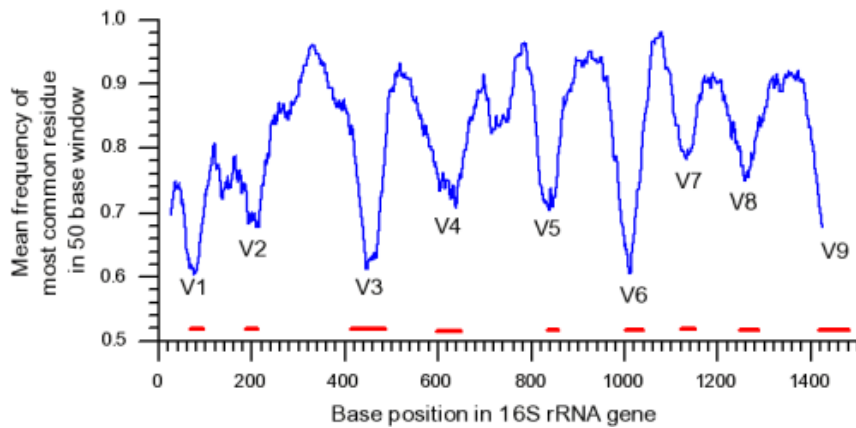
Katses osalenud inimesed:

- 154 indiviidi (31 ühemunaraku kaksikute paari, 23 erimunaraku kaksikute paari, nende kaksikute emad)
- 29% elavad vanematekodus, ülejäänud kuni 800 km kaugusel, kõik siiski USAs
- Enamus ei olnud võtnud antibiootikume viimase 6 kuu jooksul
- Kõigilt võeti kaks proovi kahekuulise vahega

Bakteriaalne 16S rRNA

sisaldab 9 varieeruvat regiooni, neist V2 ja V6 on sagedasti kasutusel prokarüootide uurimisel.

2238 *Nucleic Acids Research, Vol. 18, Supplement*



Neefs et al 1990, NAR

Turnbaugh et al. Nature 2009

A core gut microbiome in obese and lean twins.

Metoodika 1. 16S rDNA sekveneerimine

- 10-20 g proovist saadi 200 mikrogrammi DNAd
- Täispika 16S rDNA PCR, millele järgneb kloonimine ja sekveneerimine
- 16S rDNA V2 ja V6 regioonide PCR ja nende multipleks sekveneerimine 454 FLX sekvenaatoriga
- Saadud järjestuste arv indiviidi kohta oli väga erinev (13000-43000 V6 järjestust). Katvuse erinevus mõjutab leitud liigirikkuse erinevust. Selle vältimiseks kasutati juhuslikku sümplingut (näiteks 10 000 juhuslikku V6 järjestust igast indiviidist)

Turnbaugh et al. Nature 2009

A core gut microbiome in obese and lean twins.

Metoodika 2. Kogu genoomi sekveneerimine

- Täiendav bakteriaalse DNA sekveneerimine kogu genoomi ulatuses 18 indiviidil (3 paksu ja 3 normaalset ühemunaraku kaksikut + ema) 454 FLX and 454 Titanium tehnoloogiatega
- Võimaldas hinnata erineva funktsiooniga geenide hulka mikrobioomis tervikuna.

Turnbaugh et al. Nature 2009

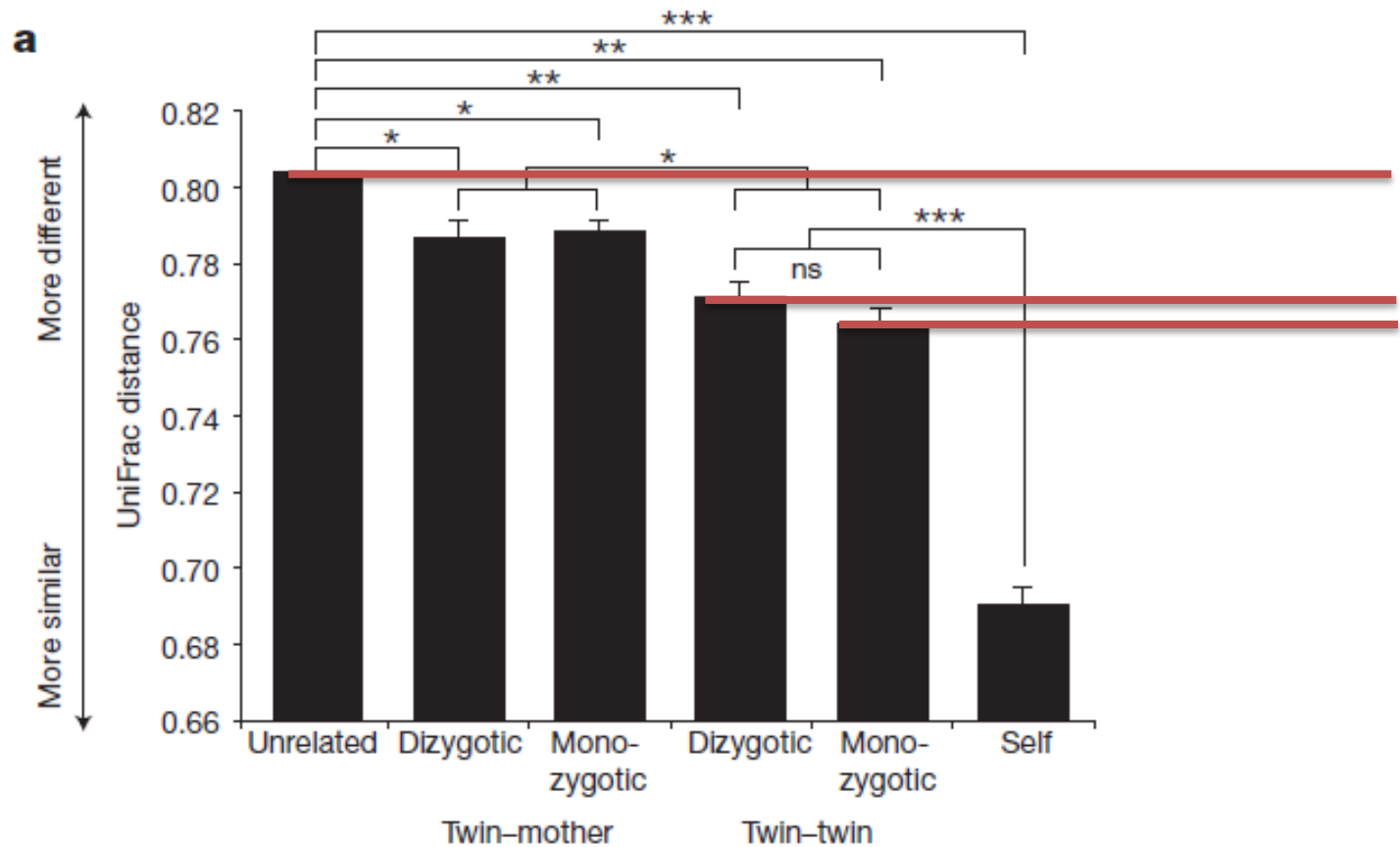
A core gut microbiome in obese and lean twins.

Metoodika 3. Liikide identifitseerimise tööriistad.

- 16S RNA fragmentide leidmiseks/kinnitamiseks kasutati **BLASTN** RDB andmebaasi vastu (Ribosomal DataBase)
`Bit-score>50; %identity>50; alignment length≥100`
- Leitud fragmendid joondati **NAST** programmiga ja lisati referentspuule ARB programmi abiga (Taxonomy was assessed after insertion into an **ARB** neighbor-joining tree)
- Genereeritud genoomsed järjestuse fragmendid joondati tuntud soolebakterite genoomide (n=44) vastu ja liik määrati parima **BLASTX** hiti leidmisega `Bit-score>50; %identity>50;`
- Kahe indiviidi mikrofloora sarnasuse leidmiseks kasutati **UniFrac** programmi. See kasutab kauguse arvutamisel kahes fülogeneesipuus olevate ühiste harude arvu.

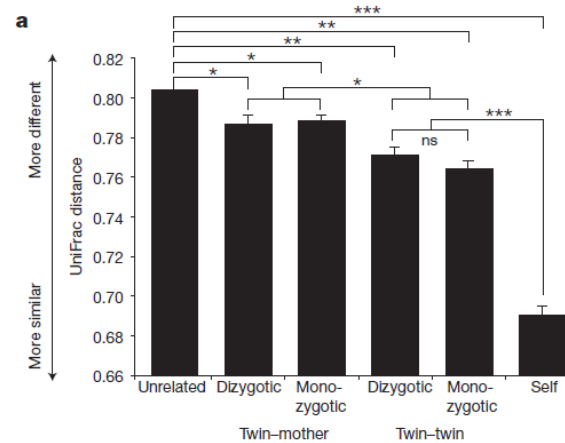
Tulemused:

1a. Keskkonnal on soole mikrofloorale tunduvalt suurem mõju kui inimese geneetilisel taustal



Tulemused:

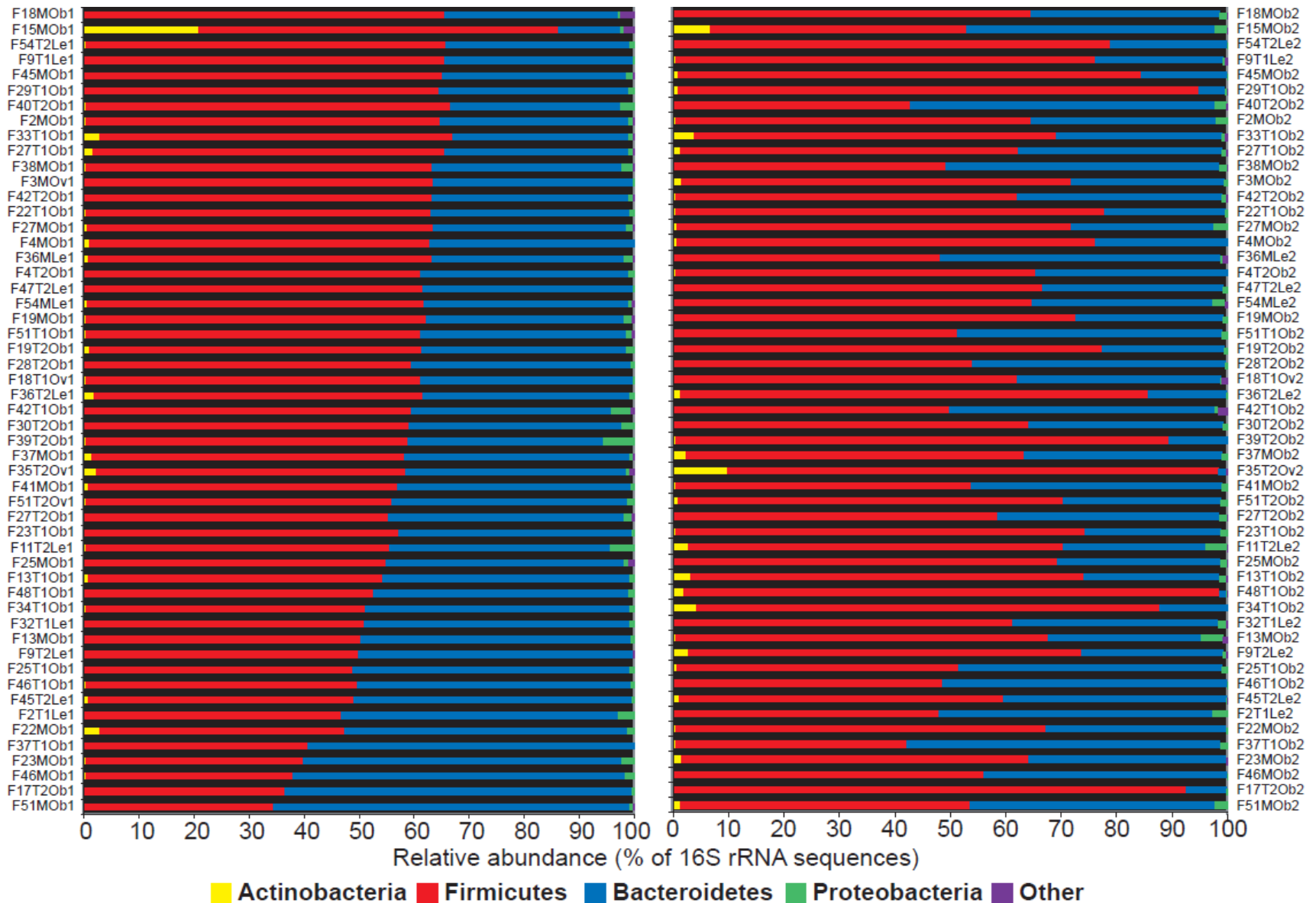
1a. Keskkonnal on soole mikrofloorale tunduvalt suurem mõju kui inimese geneetilisel taustal



Ei leitud olulist korrellatsiooni inimeste elukoha geograafilise kauguse ja mikrofloora erinevuse vahel.

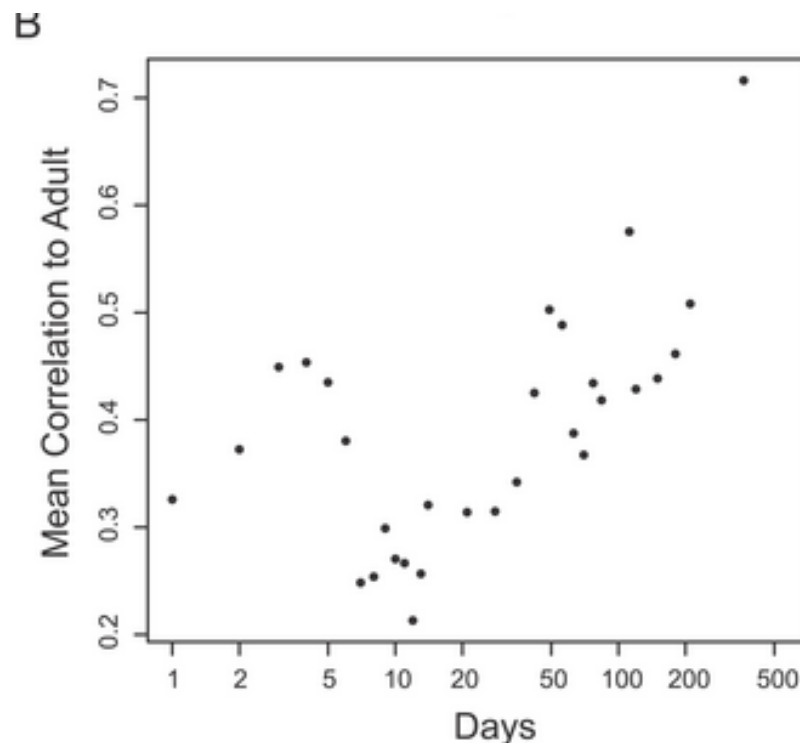
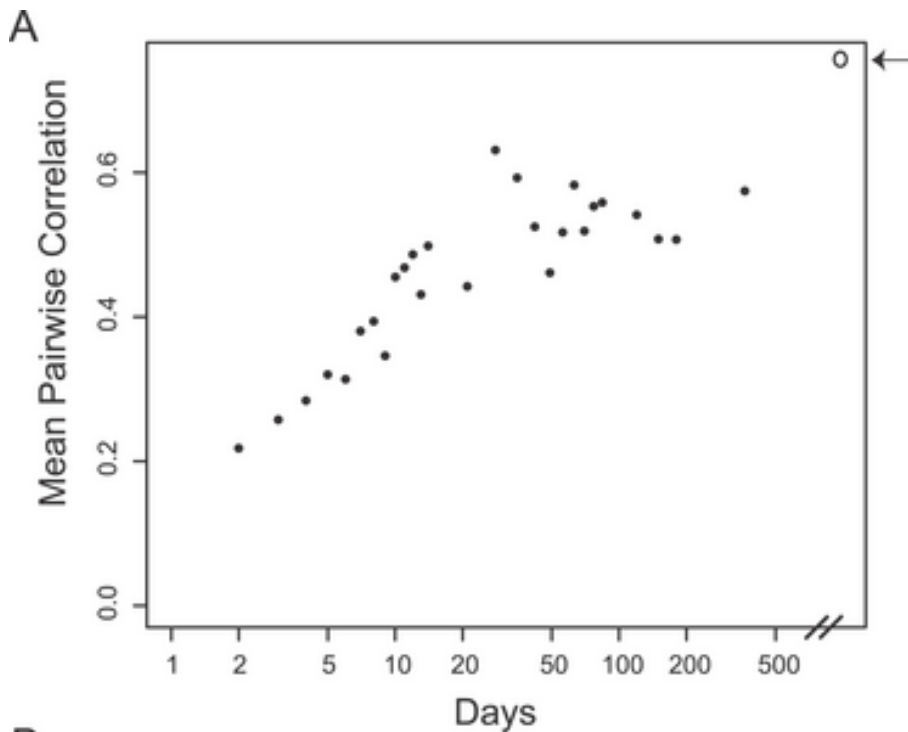
Tulemused:

1b. Ajapunktide vaheline varieeruvus on märkimisväärne



On näidatud, et vastsündinute mikrofloora on väga varieeruv ja täiskasvanule iseloomulik mikrofloora kujuneb välja esimese kahe eluaasta jooksul:

<http://www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0050177>

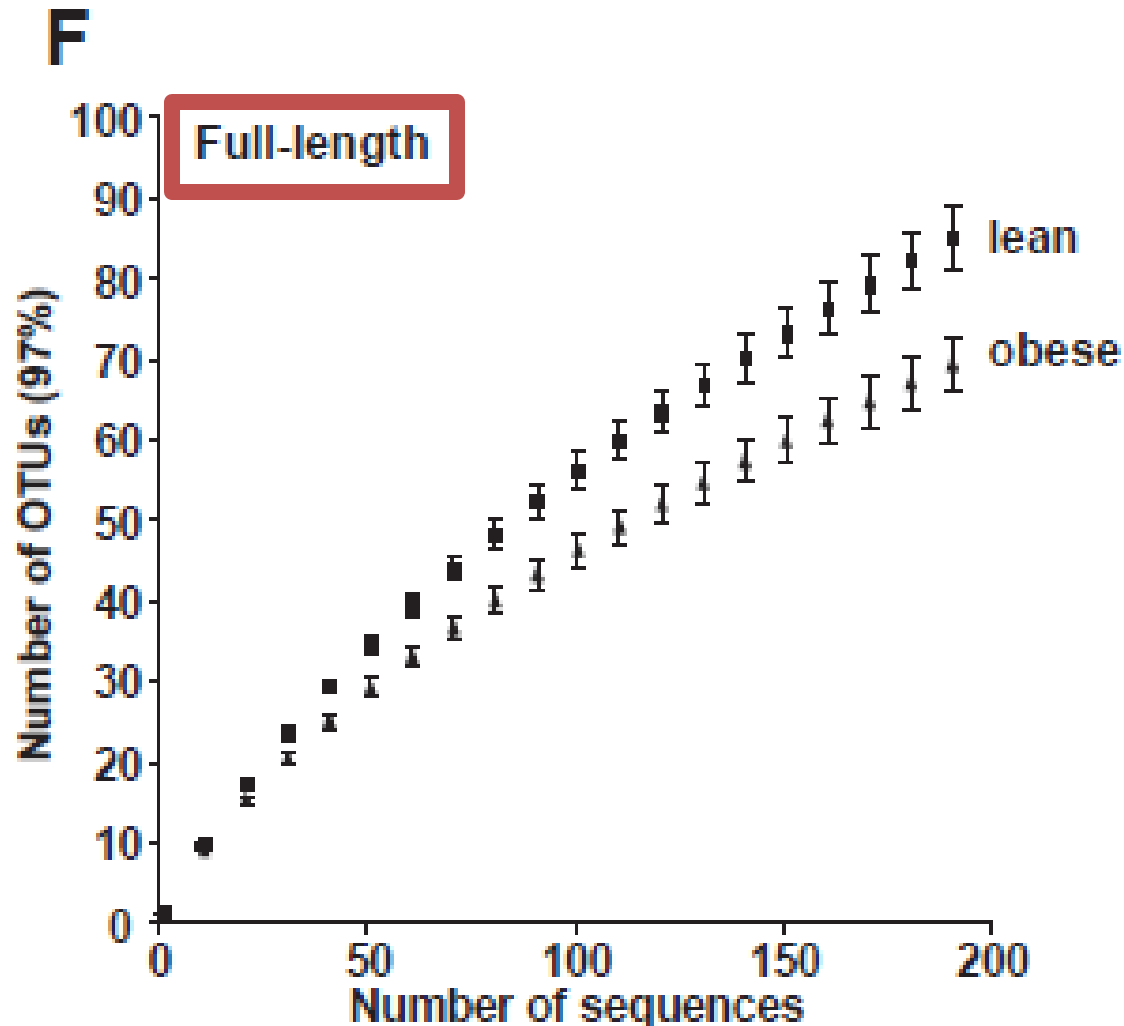


o <---

tähistab täiskasvanute omavahelist keskmist korrellatsiooni

Tulemused

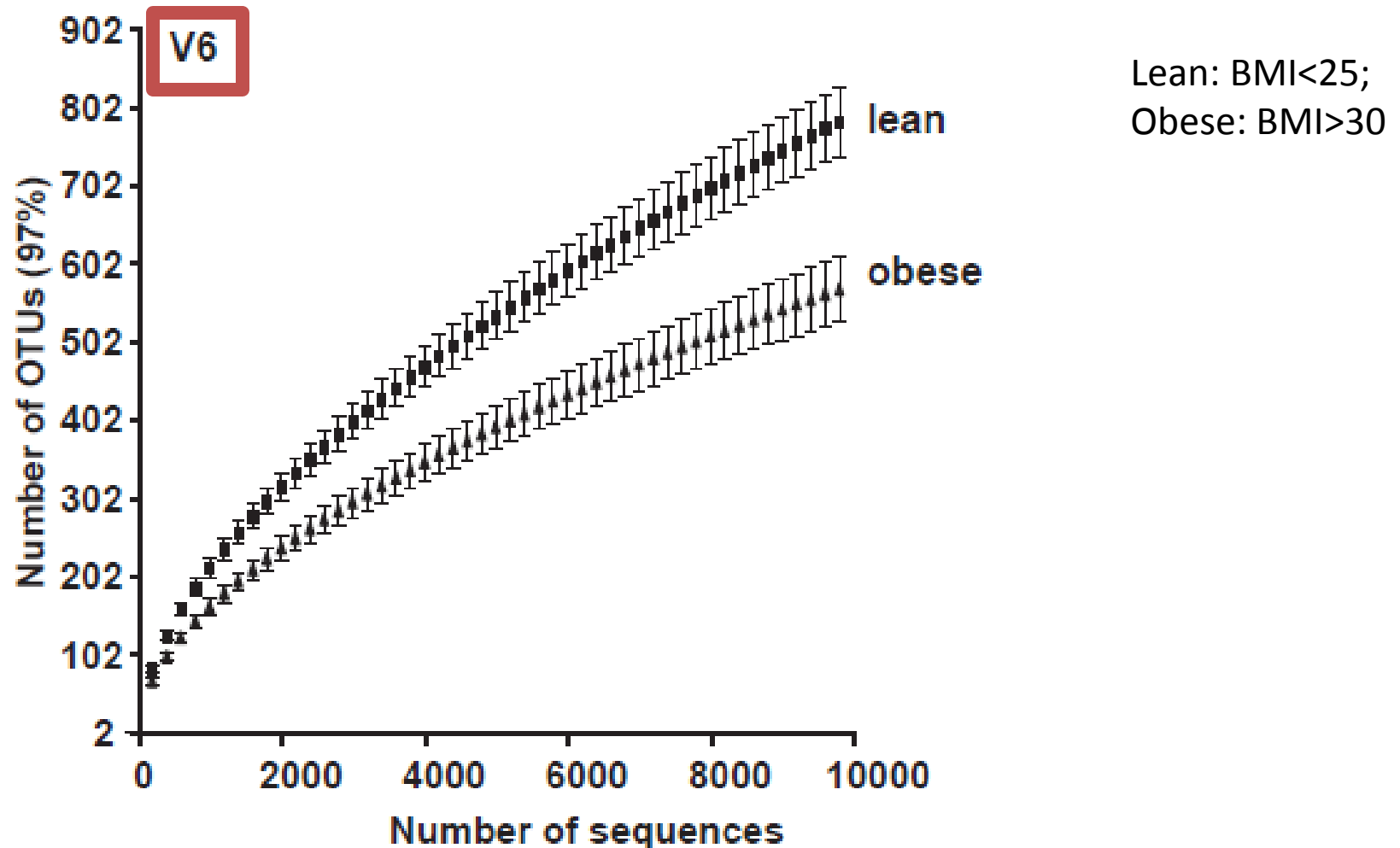
2a. Inimese tüsedus mõjutab soole mikrofloora liigirikkust



Lean: BMI<25;
Obese: BMI>30

Tulemused

2a. Inimese tüsedus mõjutab soole mikrofloora liigirikkust



Tulemused

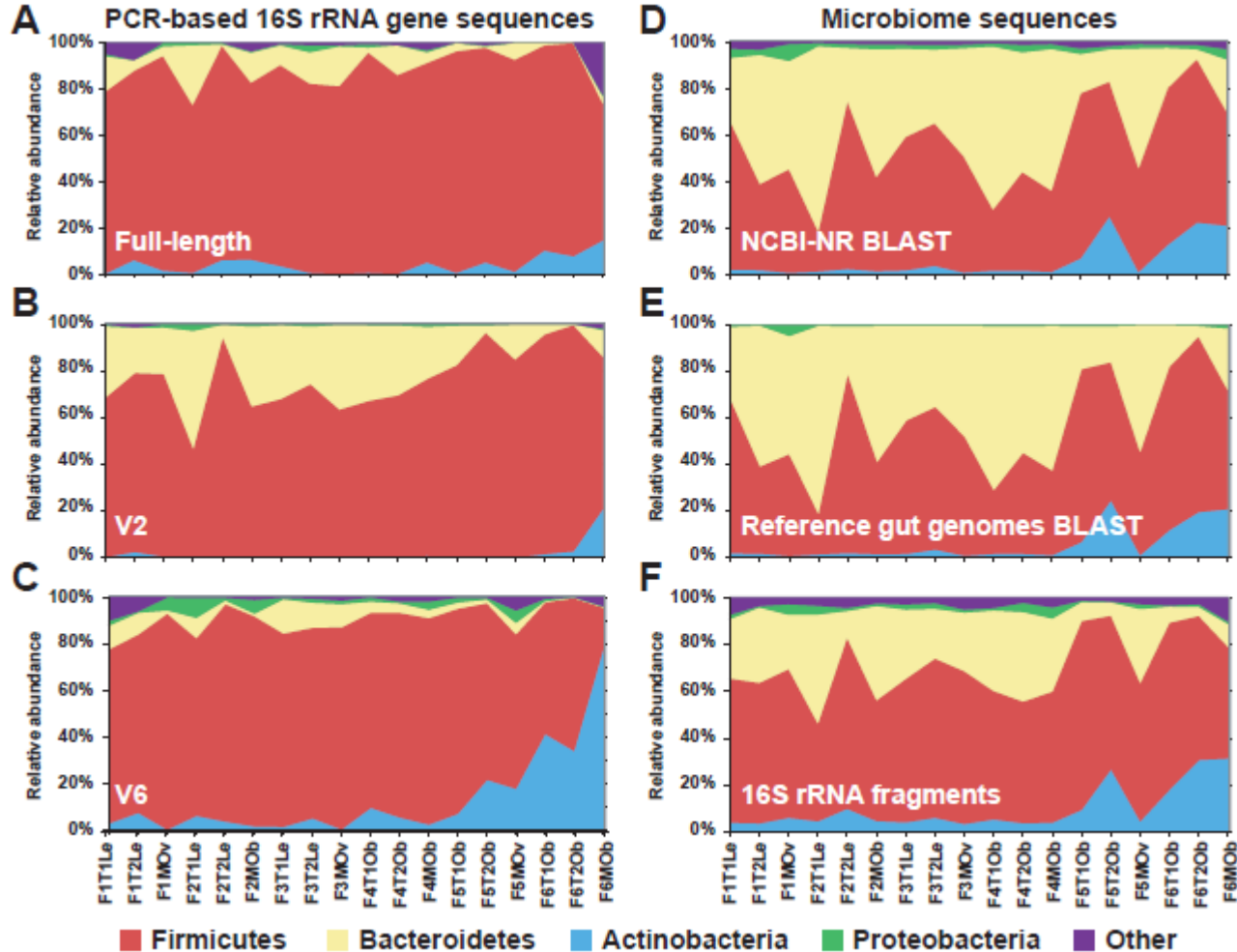
2b. Millised on liigilised erinevused paksude ja kõhnade vahel?

Supplementary Table 9: Phylum-level taxonomic assignments ^a							
		lean			obese		
		mean	sem	N	mean	sem	N
V2 (EA)	%Bacteroidetes	26.76	2.46	26	24.39	1.89	42
	%Firmicutes	71.48	2.50	26	72.57	1.92	42
	%Actinobacteria	0.72	0.14	26	1.70	0.58	42
V2 (AA) ^b	%Bacteroidetes	37.52	3.05	8	29.41	1.49	62
	%Firmicutes	60.74	3.04	8	68.14	1.42	62
	%Actinobacteria	0.97	0.40	8	1.27	0.21	62
V6 (EA)	%Bacteroidetes	6.85	1.25	12	3.15	0.93	16
	%Firmicutes	81.72	2.41	12	75.99	4.60	16
	%Actinobacteria	7.14	1.76	12	17.91	5.01	16
Full-length (EA)	%Bacteroidetes	11.44	2.77	10	7.58	2.35	16
	%Firmicutes	83.50	2.28	10	84.60	3.03	16
	%Actinobacteria	2.78	0.78	10	4.41	1.14	16

sekvenerismetoodika ja uuritav rDNA piirkond mõjutab tulemust märkimisväärselt

Tulemused

2c. Millised on erinevused kasutatud meetodikate vahel?



Tulemused

3a. Kas on olemas tuumik-liigid, mis esinevad kõigil inimestel?

- Antud uuringus ei leitud mitte ühtegi liiki, mis oleks esinenud kõigil 154 uuritud inimesel
- Samuti oli indiviidide vahel väga varieeruv liikide arvukus (leitud järjestuste arv liigi kohta)

Kümme kõige sagedamini esinevat liiki:

Supplementary Table 8: Phylotypes shared across $\geq 70\%$ of all individuals (Full-length dataset; 200 random sequences)

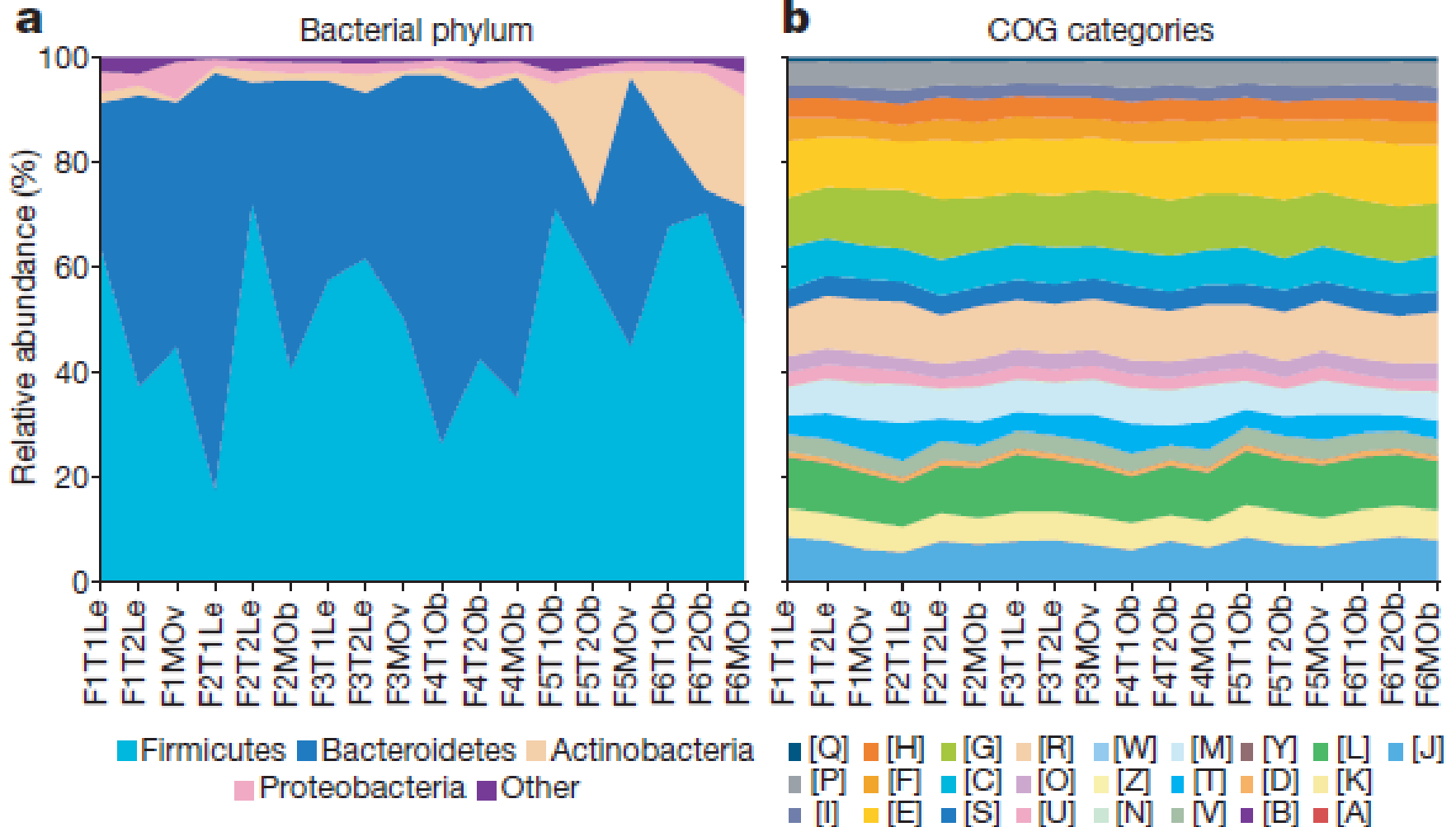
Phylotype ID	Individuals with phylotype	% of individuals with phylotype	Number of reads grouped into phylotype	Highest relative abundance across all individuals	Lowest relative abundance across all individuals	Mean \pm sem % of 16S rRNA gene sequences across all individuals
1	28	93.3	378	17.9	0.0	7.81 \pm 1.04
2	27	90.0	347	25.0	0.0	6.90 \pm 1.20
3	26	86.7	128	9.9	0.0	2.62 \pm 0.47
4	26	86.7	298	23.1	0.0	6.00 \pm 1.14
5	26	86.7	127	12.0	0.0	2.64 \pm 0.49
6	22	73.3	110	10.9	0.0	2.33 \pm 0.55
7	22	73.3	87	5.7	0.0	1.76 \pm 0.29
8	21	70.0	112	11.9	0.0	2.32 \pm 0.49
9	21	70.0	75	6.9	0.0	1.53 \pm 0.32
10	21	70.0	54	5.7	0.0	1.14 \pm 0.23

^aBased on the consensus taxonomy of $\geq 90\%$ sequences within each phylotype (best-BLAST-hit against the Greengenes database)

Phylotype ID	Taxonomic classification ^a
1	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Faecalibacterium
2	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcus
3	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales
4	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacterium_rectale
5	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridium_clostridioforme
6	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidales; Bacteroidaceae
7	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridium_nexile; Clostridium_fusiformis
8	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Coprococcus
9	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridium_nexile
10	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridium_nexile

Tulemused

3b. Tuumikliikide asemel esinevad tuumik-geenid?



Tulemused

3c. Paksude ja kõhnade inimeste mikrobioomi erinevused

Supplementary Table 12: KEGG Pathways enriched or depleted in the distal gut microbiome of obese twins^a

Enriched	Depleted
Fatty acid biosynthesis	Bacterial chemotaxis
Nicotinate and nicotinamide metabolism	Bacterial motility proteins
Other ion-coupled transporters	Benzoate degradation via CoA ligation
Other transporters	Butanoate metabolism
Pentose and glucuronate interconversions	Citrate cycle (TCA cycle)
Phosphotransferase system (PTS)	Glycosaminoglycan degradation
Protein folding and associated processing	Other enzymes
Signal transduction mechanisms	Oxidative phosphorylation
Transcription factors	Pyruvate/Oxoglutarate oxidoreductases
	Starch and sucrose metabolism
	Tryptophan metabolism

Paksudel esinevad geenid

Kõhnadel esinevad geenid

^aIdentified by comparing KEGG pathway abundance in the variable component of the fecal microbiomes of obese versus lean MZ twins using a bootstrap algorithm ($p < 0.01$)

Qin et al. Nature 2010

A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.

Massiline soole mikrofloora sekveneerimine 124 euroopa päritolu inimesel Illumina Genome Analyzer'iga.

Kogu DNA sekveneerimine - 2.0 - 7.3 Gb järjestust iga indiviidi kohta.

Peamine rõhk geenide uurimisel, mitte liikide uurimisel.

Võrreldi 3 fenotüübiga inimesi: normaalsed, Crohni haigus ja IBD (Inflammatory Bowel Disease)

Qin et al. Nature 2010

A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.

Igal inimesel leiti vähemalt 160 erinevat liiki baktereid.

Leiti ka tuumikliigid:

18 liiki, mis esinesid kõigis inimestes

57 liiki, mis esinesid > 90% inimestel

Liike detekteeriti SOAP programmiga, otsides sarnasust avalikes andmebaasides olevate bakterigenoomidega.

Siiski - nende liikide arvukus on inimeste vahel kuni 2000 korda erinev

Qin et al. Nature 2010

A human gut microbial gene catalogue
established by metagenomic sequencing.

18 liiki, mis leiti kõigis inimestes:

Bacteroides capillosus

Bacteroides dorei

Bacteroides finegoldii

Bacteroides vulgatus ATCC 8482

Bacteroides xylanisolvens XB1A

Bacteroides sp. 2_1_7

Bacteroides sp. 2_2_4

Bacteroides sp. 9_1_42FAA

Bacteroides sp. D4

Clostridium nexile

Clostridium sp M62 1

Coprococcus comes SL7 1

Faecalibacterium prausnitzii SL3 3

Roseburia intestinalis M50 1

Ruminococcus lactaris

Ruminococcus obeum A2-162

Ruminococcus torques L2-14

Ruminococcus sp SR1 5

Kas soolepõletikuga haigetel ja tervetel inimestel on erinev mikrofloora?

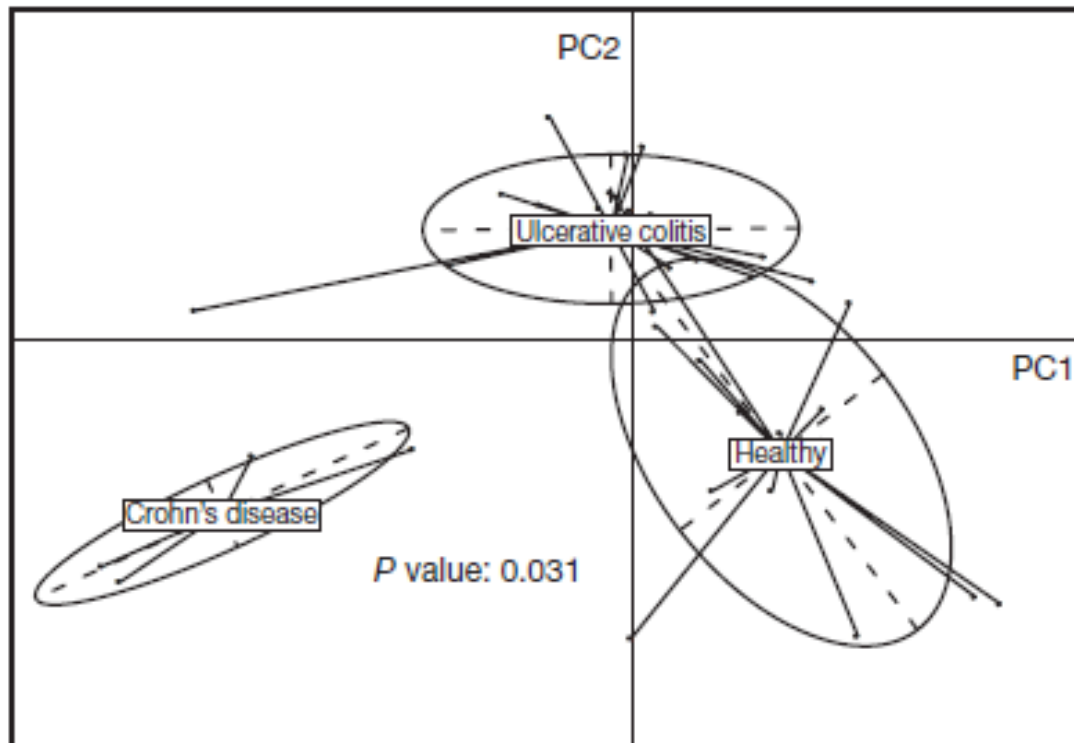


Figure 4 | Bacterial species abundance differentiates IBD patients and healthy individuals. Principal component analysis with health status as instrumental variables, **based on the abundance of 155 species** with >1% genome coverage by the Illumina reads in at least 1 individual of the cohort, was carried out with 14 healthy individuals and 25 IBD patients (21 ulcerative colitis and 4 Crohn's disease) from Spain (Supplementary Table 1). Two first components (PC1 and PC2) were plotted and represented 7.3% of whole inertia.