

МИКРОБНАЯ ЭКОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА



Самое непостижимое в мире –
то, что он постижим
А. Эйнштейн

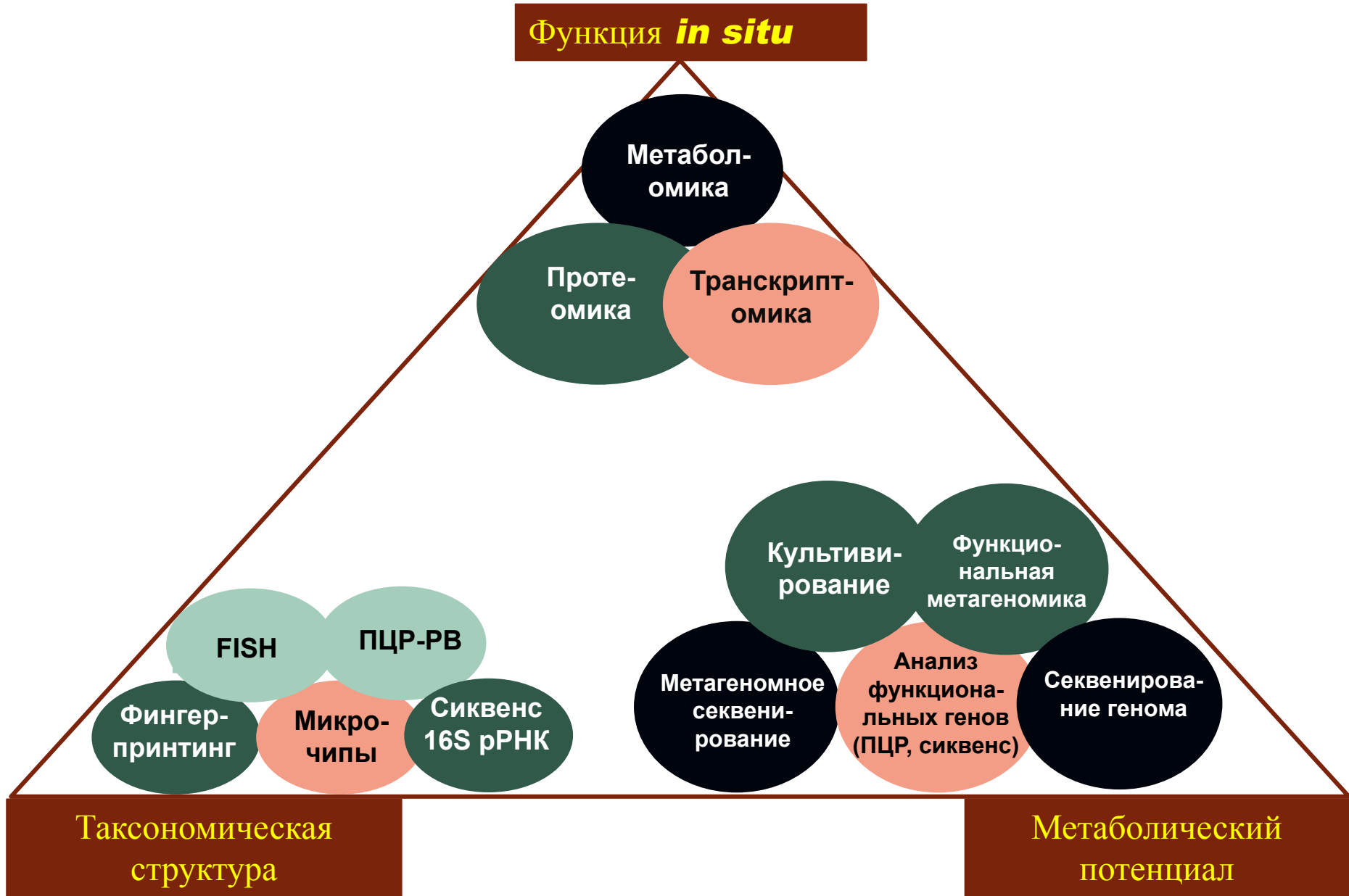
МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА ЧЕЛОВЕКА

ВОПРОСЫ:

- ❖ Какие микроорганизмы «населяют» различные биотопы организма здорового человека?
- ❖ Как изменяется качественный и количественный состав нормальной микробиоты человека в зависимости от возраста, рациона питания, заболеваний, др.?
- ❖ Какие функции выполняет нормальная микробиота в организме человека?
- ❖ Какова роль микробиома человека в поддержании здоровья, развитии определенных заболеваний и патологий?



МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА



МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА

Культуральные

Молекулярно-генетические

Культура Геномика

Физиолого-биохимические,
генетические признаки

ПЦР

Метагеномика

Культуромика,
таксогеномика

Морфология,
ростовые
потребности,
патогенность

Хемотаксономия,
нумерическая
таксономия,
ДНК-ДНК
гибридизация

16S рДНК
амплификация,
клонирование,
секвенирование

Микрочипы,
ПЦР-РВ, FISH,
ДНК-
фингерпринтинг

Культивирование,
протеомика,
геномика

Конец
19 века

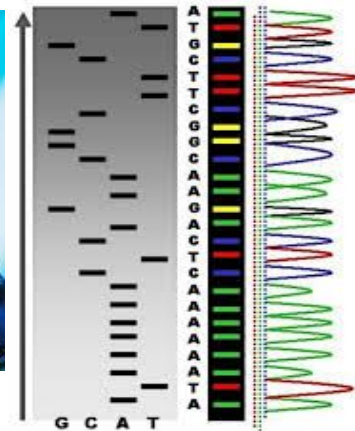
1960

1980

1990

2000

2010

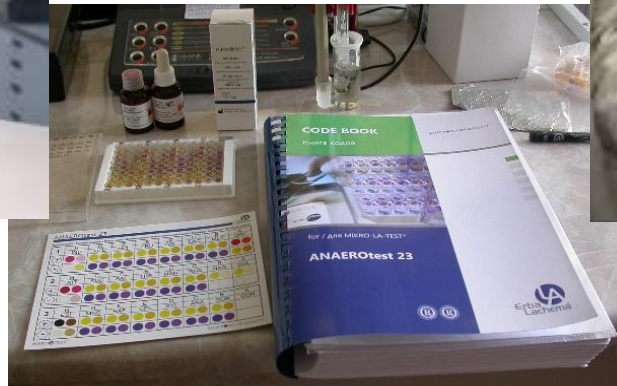


КЛАССИЧЕСКИЕ (КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ) МЕТОДЫ

Современные методы культивирования позволяют выявить < 1% от общего количества микроорганизмов, содержащихся в образце

Принцип метода:

- ❖ Посев разведений на специальные (дифференциально-диагностические, селективные, элективные) питательные среды;
- ❖ Выделение чистых культур микроорганизмов;
- ❖ Изучение морфологических, физиолого-биохимических свойств;
- ❖ Идентификация с использованием молекулярно-генетических методов



КЛАССИЧЕСКИЕ (КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ) МЕТОДЫ

Достоинства:

- ❖ невысокая стоимость и простота анализа;
- ❖ отсутствие необходимости специального дорогостоящего оборудования и технологичных методов анализа;
- ❖ отсутствие необходимости в высококвалифицированных специалистах

Недостатки:

- ❖ невозможность анализа «некультивируемых» микроорганизмов;
- ❖ невозможность дифференцировать микроорганизмы со схожими фенотипическими признаками;
- ❖ трудо-и времяемкий анализ;



1		H IND	G DYS	F ORN	E URE	D SUC	C SOR	B TRE	A GLU
	+	pink	blue	blue	red	yellow	yellow	yellow	yellow
	-	yellow	green	green	orange	green	green	green	green
2		H PYR	G ESC	F CEL	E MIB	D SAL	C MNS	B MIT	A RAF
	+	red	black	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
	-	yellow	white	green	green	green	green	green	green
3		H VPT	G PHE	F MAL	E ONP	D GLP	C UGA	B LXY	A NAG
	+	red	orange	blue	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
	-	white	yellow	green	white	white	white	white	white

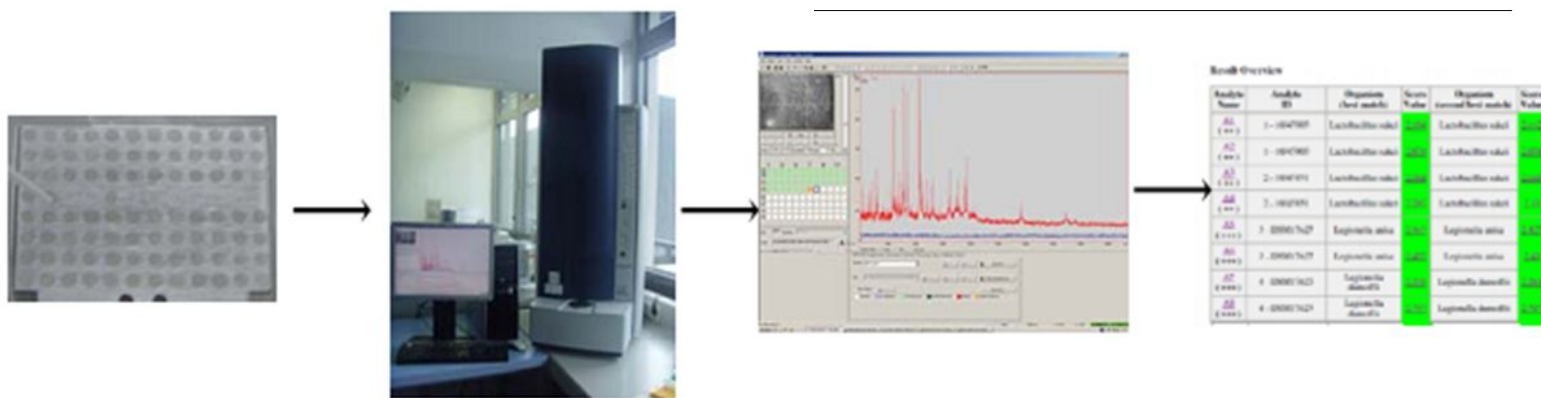
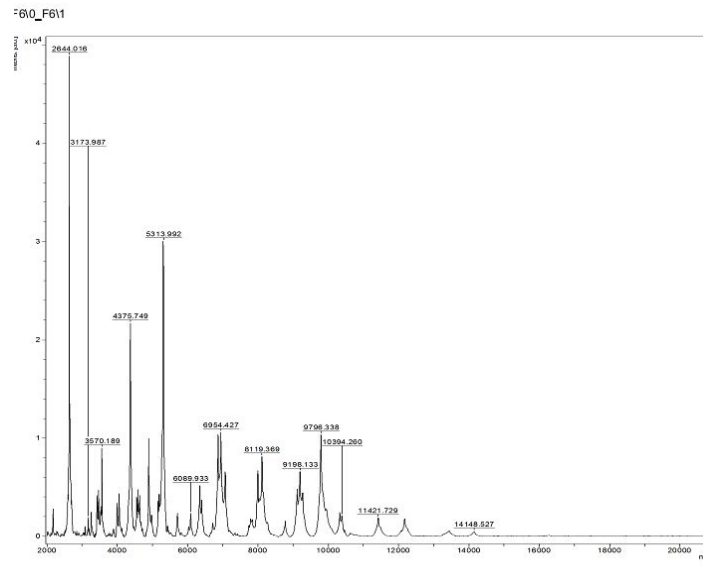
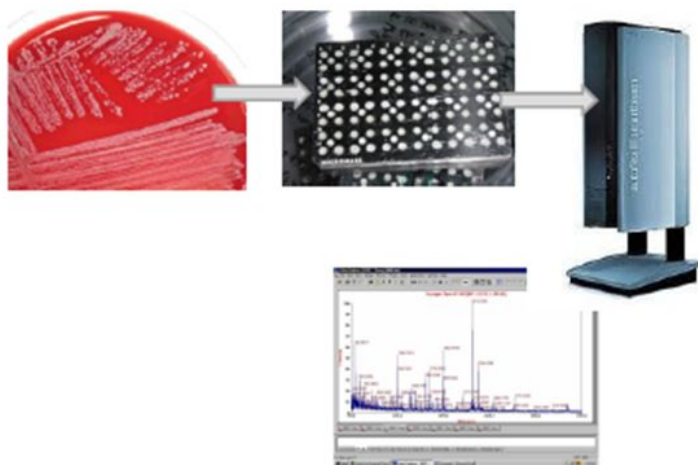
КУЛЬТУРОМИКА

- Конструирование питательных сред и условий, моделирующих кишечный тракт человека;
- Исследование выделенных микроорганизмов с помощью молекулярно-генетических и хемотаксономических методов
 - Секвенирование генома;
 - Белковое профилирование с помощью MALDI-TOF MS
 - Анализ жирнокислотного состава

Культивирование фекалий 2 тощих африканцев и 1 тучного европейца при 212 различных условиях:

- получено 32 000 колоний
- методом MALDI-TOF идентифицировано 340 видов:
 - 174 вида ранее не описанных у человека;
 - 31 новый вид;
 - 10 000 ранее неизвестных генов

MALDI-TOF MS анализ бактериальных культур



The sample is applied to a metal target plate and overlaid with matrix

The plate is introduced into a MALDI mass spectrometer

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

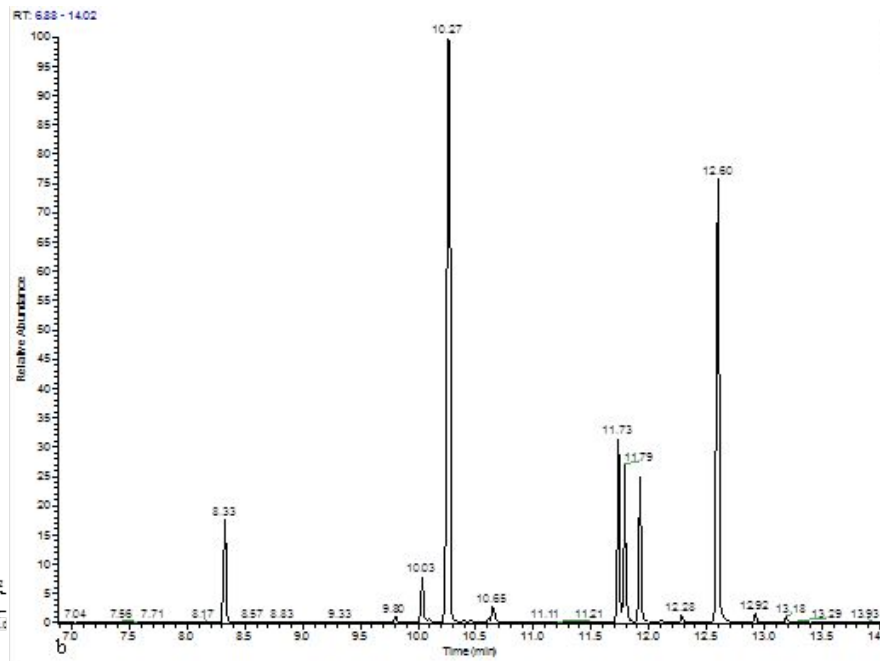
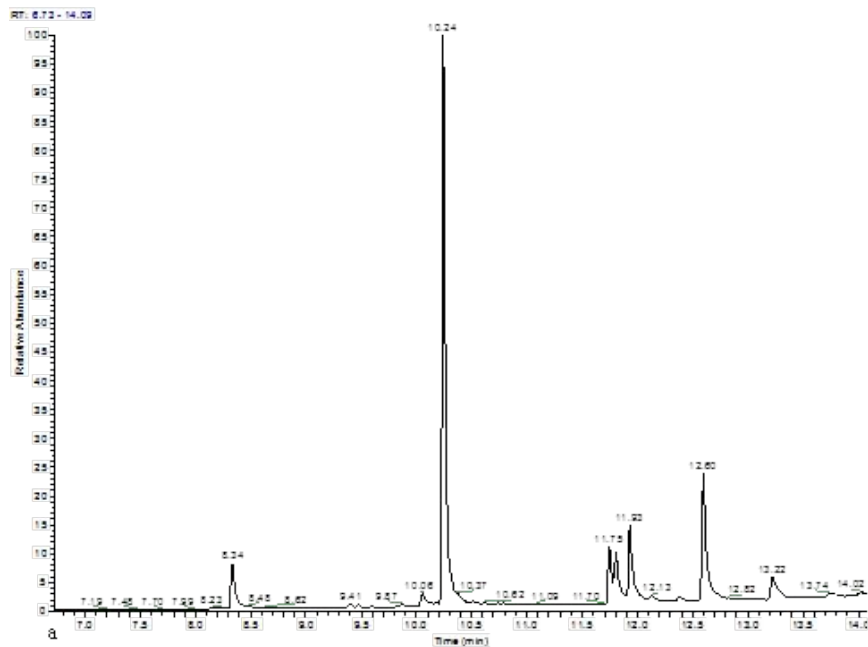
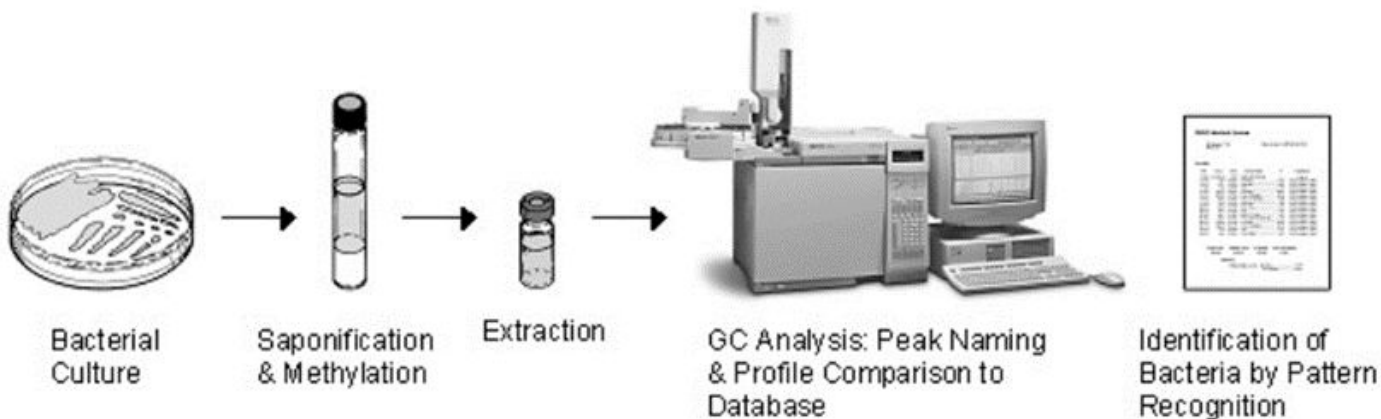
MALDI-TOF MS идентификация

- метод MALDI-TOF MS основан на сравнительном анализе протеома бактерий
- биомаркеры, используемые для идентификации бактерий, - рибосомные белки;
- дешевый и быстрый (пробоподготовка ~20 мин) метод идентификации;
- коммерческая система для идентификации микроорганизмов на базе MALDI-TOF MS (Brucker Daltonics) имеет базу данных, содержащую белковые профили более 5 400 штаммов бактерий;
- возможно анализировать другие компоненты бактериальных клеток

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ БАКТЕРИЙ КАК ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

- Описано более 300 жирных кислот, обнаруживаемых в бактериальных клетках
- Большинство бактерий синтезируют жирные кислоты, содержащие от 10 до 19 атомов углерода
- Характерной особенностью бактерий является присутствие в *пальмитиновой (гексадекановой)* кислоты
- Существуют *количественные* (на уровне вида) и *качественные* (на уровне рода) отличия в жирнокислотном составе бактерий разных таксономических групп
- Высокое содержание *насыщенных* и *мононенасыщенных неразветвленных* жирных кислот с *нечетным* числом атомов углерода в цепи и присутствие кислот с *гидроксильной группой* характерно для **грамотрицательных** бактерий
- **Грамположительные** бактерии характеризуются высоким содержанием *насыщенных разветвленных и неразветвленных* жирных кислот с *четным* числом атомов углерода в цепи, а также присутствием *циклопропановых* жирных кислот
- Разработана коммерческая система для идентификации микроорганизмов на основании анализа состава жирных кислот **MIDI Sherlock Microbial Identification System**, содержащая в базе данных жирнокислотные профили более *1 500 видов* бактерий

ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ОСНОВАННАЯ НА ИЗУЧЕНИИ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

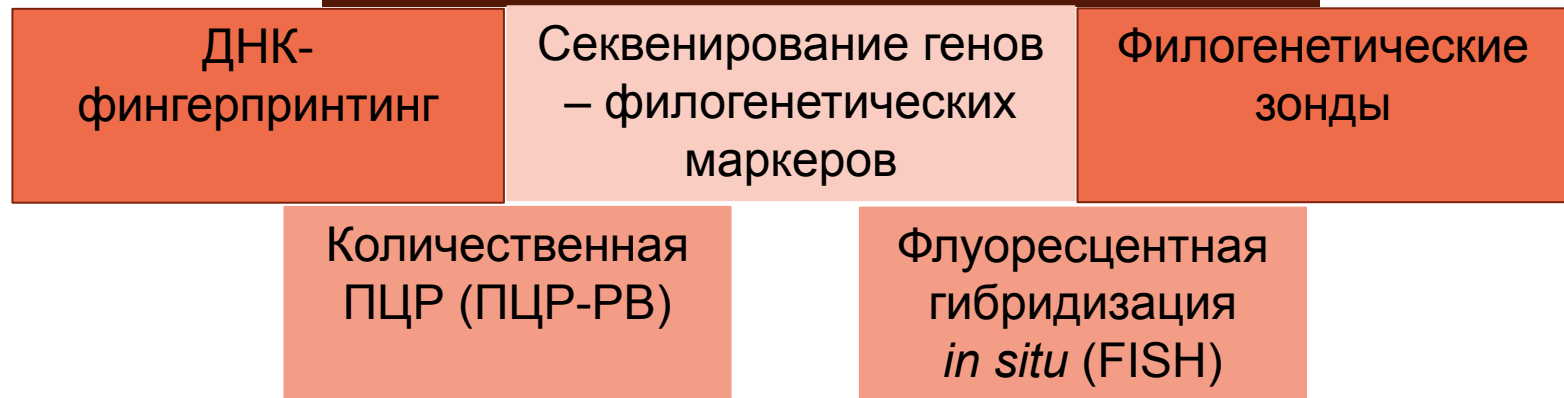


МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Достоинства:

- ❖ установление эволюционного родства микроорганизмов;
- ❖ дифференциация бактериальных культур, относящихся к разным видам, со схожими морфологическими и физиолого-биохимическими признаками;
- ❖ выявление и идентификация «некультивируемых» микроорганизмов.

Таксономическая структура микробиома



ДНК-ФИНГЕРПРИНТИНГ

Достоинства:

- ❖ невысокая стоимость и быстрота анализа;
- ❖ возможность сравнительной характеристики микробных сообществ;
- ❖ анализ динамики видового разнообразия сообществ

Недостатки:

- ❖ невозможность таксономической идентификации микроорганизмов в сообществе

ДГГЭ (DGGE)

денатурирующий градиентный гель-электрофорез

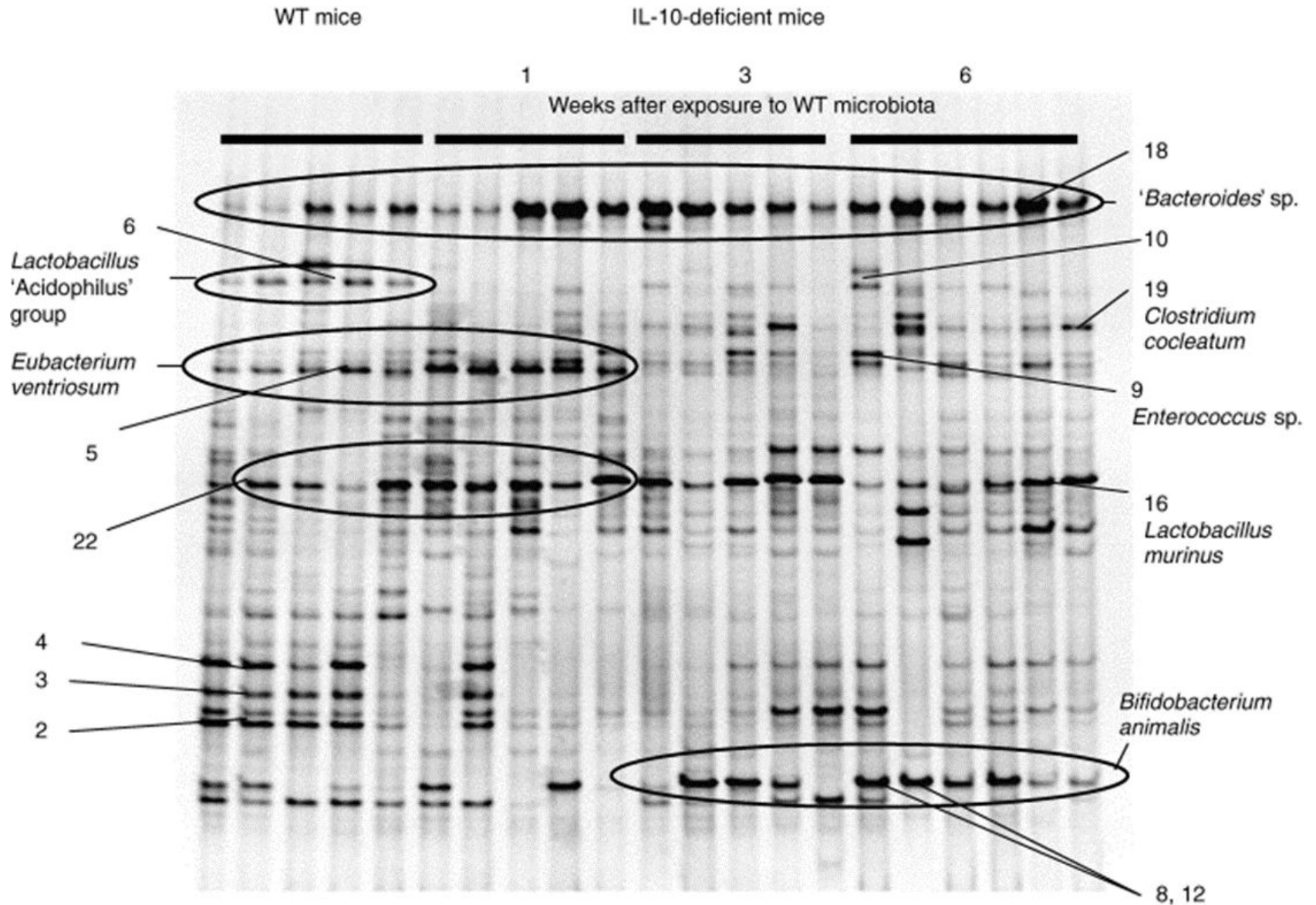
ТГГЭ (TGGE)

температурный градиентный гель-электрофорез

Принцип метода:

- ❖ ПЦР-амплификация целевого гена (чаще гена 16S рРНК);
 - ❖ Разделение продуктов ПЦР методом градиентного гель-электрофореза
 - ❖ Каждая полоса на геле = ампликон с уникальной нуклеотидной последовательностью = определенный вид микроорганизмов;
- ! Не всегда одна полоса соответствует одному виду микроорганизма (ампликоны с различной нуклеотидной последовательностью и одинаковой подвижностью)
- ! Интересующие полосы можно вырезать из геля и секвенировать

ДГГЭ-профили микробиоты дистального отдела кишечника мыши дикого типа и мыши, дефектной по IL-10



T-RFLP – terminal-restriction fragment length polymorphism

(полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов)

Принцип метода:

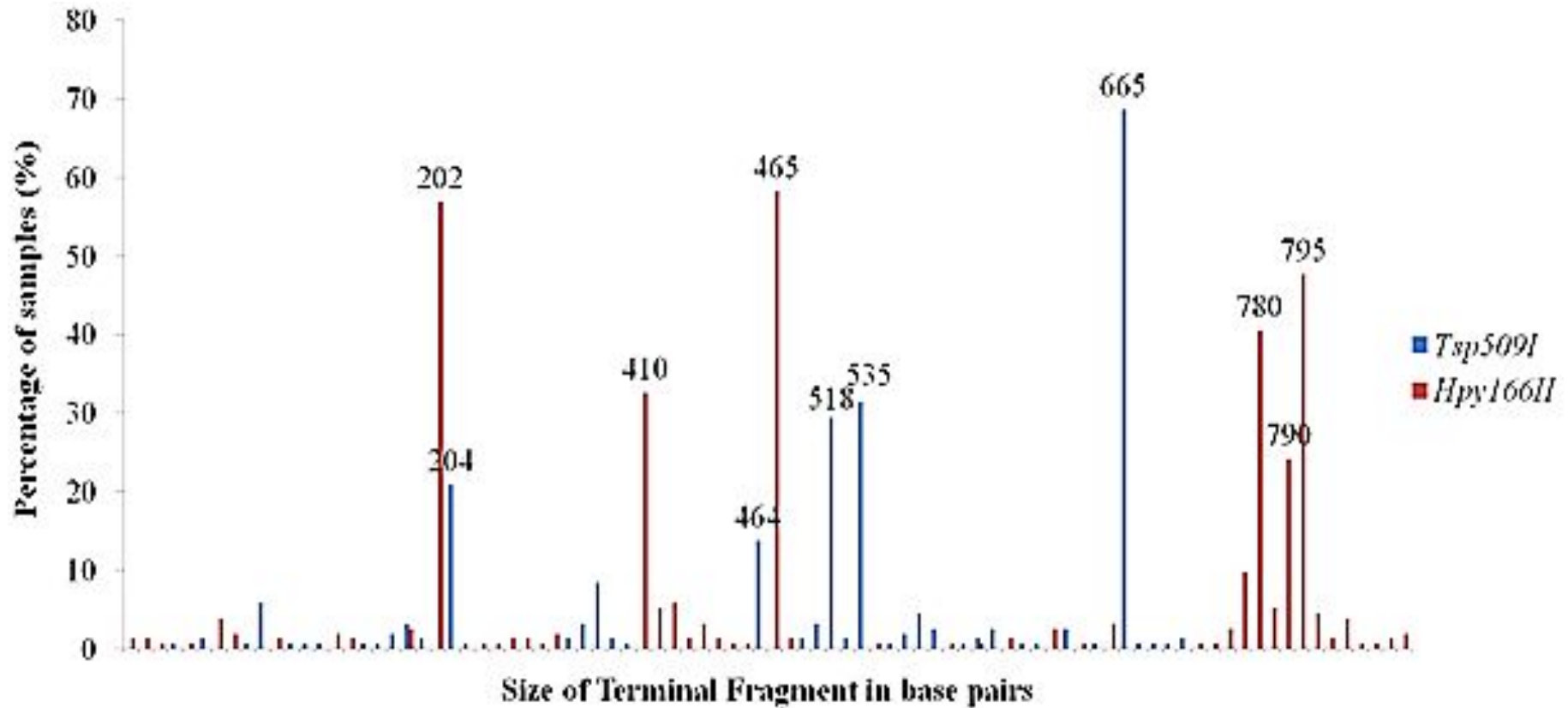
- ❖ ПЦР-амплификация целевого гена (чаще гена 16S рРНК) с определенным набором праймеров, один или оба из которых имеют флуоресцентную метку;
 - ❖ Рестрикция полученного фрагмента с использованием мелкощепящих рестриктаз (сайт узнавания – 4 п.н.);
 - ❖ Гель-электрофорез для определения относительного количества терминальных рестрикционных фрагментов;
 - ❖ Каждая полоса на геле = определенный вид микроорганизмов.
- ! Разрешающая способность метода зависит от правильности выбора амплифицируемого гена и рестрицирующего фермента;
- ! При анализе сообществ, включающих более 50 родов бактерий, выявляется до 70 % присутствующих бактерий

**Рассчитанные и наблюдаемые терминальные рестрикционные фрагменты (п.н.)
расщепления гена **16S** рРНК
рестриктазами **TSP509I** и **Hpy166I** (меченный праймер **8f**)**

Sample species name	<i>TSP509I</i>		<i>Hpy166I</i>	
	<i>In silico</i>	<i>In vitro</i>	<i>In silico</i>	<i>In vitro</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	207	204	470	465
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	671	665	470	465
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	671	664	206	202
<i>Streptococcus gordonii</i>	186	195	480	475
<i>Streptococcus pyogenes</i>	195	189	804	795
<i>Streptococcus sanguinis</i>	174	169	472	467
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	547	538	793	784
<i>Rhodococcus equi</i>	523	515	79	73
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	524	516	415	410
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	558	549	805	794
<i>Staphylococcus aureus</i>	558	549	472	465
<i>Haemophilus influenzae</i>	469	463	798	790
<i>Moraxella catarrhalis</i>	541	535	788	780
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	549	540	796	784

Brugger SD, Frei L, Frey PM, Aebi S, Mühlemann K, et al. (2012) 16S rRNA Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for the Characterization of the Nasopharyngeal Microbiota. PLoS ONE 7(12): e52241. doi:10.1371/journal.pone.0052241

T-RFLP анализ микробиоты носоглотки 153 младенцев с острым отитом



Brugger SD, Frei L, Frey PM, Aebi S, Mühlemann K, et al. (2012) 16S rRNA Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism for the Characterization of the Nasopharyngeal Microbiota. PLoS ONE 7(12): e52241. doi:10.1371/journal.pone.0052241

ARISA - automated rRNA intergenic spacer analysis

(автоматизированный анализ межгенной рРНК области)

Принцип метода:

- ❖ Амплификация межгенной области 16S-23S рРНК с праймерами, комплементарными консервативным областям концевых участков обоих генов;
 - ❖ Один из используемых праймеров несет флуоресцентную метку, что позволяет с помощью секвенирования определять нуклеотидную последовательность амплифицированной области;
 - ❖ Нуклеотидная последовательность межгенной области 16S-23S рРНК переменчива, что предоставляет возможность дифференцировать представителей разных видов
- ! Данный метод обладает большей разрешающей способностью для дифференциации подвидов, чем анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОВ – ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Принцип метода:

- ❖ **Аmplификация целевого гена** (обычно гена 16S рРНК) с суммарной ДНК исследуемого микробного сообщества;
- ❖ **Использование универсальных праймеров**, комплементарных консервативным участкам целевого гена большинства известных прокариот;
- ❖ **Секвенирование полученных ампликонов:**
 - создание библиотек клонов и секвенирование по Сэнгеру
 - ✓ длина одного сиквенса - ~700 п.н.
 - ✓ при изучении структуры бактериальных сообществ кожи различных участков тела человека с помощью данного метода было получено 112 283 полноразмерных сиквенса гена 16S рРНК (проанализировано 277 клонов для каждого образца). В сообществе, состоящем из более 1000 различных видов микроорганизмов, минорные представители могут быть не обнаружены.
 - высокопроизводительное секвенирование
 - ✓ технологии Roche 454, Illumina/Solexa, ABI SOLiD;
 - ✓ длина одного сиквенса – 35-500 п.н.
 - ✓ количество сиквенсов после одного прочтения – от сотни тысяч до нескольких миллионов
- ❖ **Анализ результатов секвенирования**
Mothur (www.mothur.org) и QIIME (<http://qiime.sourceforge.net/>)

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ

Достоинства:

- ❖ простой в исполнении и относительно недорогой метод изучения микробных сообществ;
- ❖ видовая идентификация микроорганизмов в сообществе;
- ❖ позволяет обнаруживать минорные виды, не детектируемые с помощью секвенирования филогенетических маркеров и ряда других методов

Недостатки:

- ❖ детекция и идентификация исключительно тех таксонов, специфические олигонуклеотидные зонды к которым находятся в микрочипе, невозможность выявления новых и «неожидаемых» таксонов;
- ❖ можно выявить динамику численности определенного вида, но нельзя сравнить распространенность разных видов бактерий в сообществе;
- ❖ Возможность неспецифической гибридизации (ложноположительные и ложноотрицательные реакции).

Принцип метода:

- ❖ получение ДНК или кДНК исследуемого образца;
- ❖ гибридизация с микрочипом, содержащим 100-1000 различных олигонуклеотидных зондов (обычно комплементарных гену 16S рРНК) в определенном положении

СПЕЦИФИЧНОСТЬ МИКРОЧИПОВ

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ

PhyloChip – обнаружение 30 000 видов бактерий в различных образцах, от почв, загрязненных ураном, до легких пациентов с пневмонией (олигонуклеотидные зонды к гену 16S рРНК)

ВЫЯВЛЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕННОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

HiTChip (human intestinal tract chip) – детекция бактерий, обитающих в пищеварительном тракте человека

HuGChip (human gut chip) - детекция бактерий, обитающих в кишечнике человека

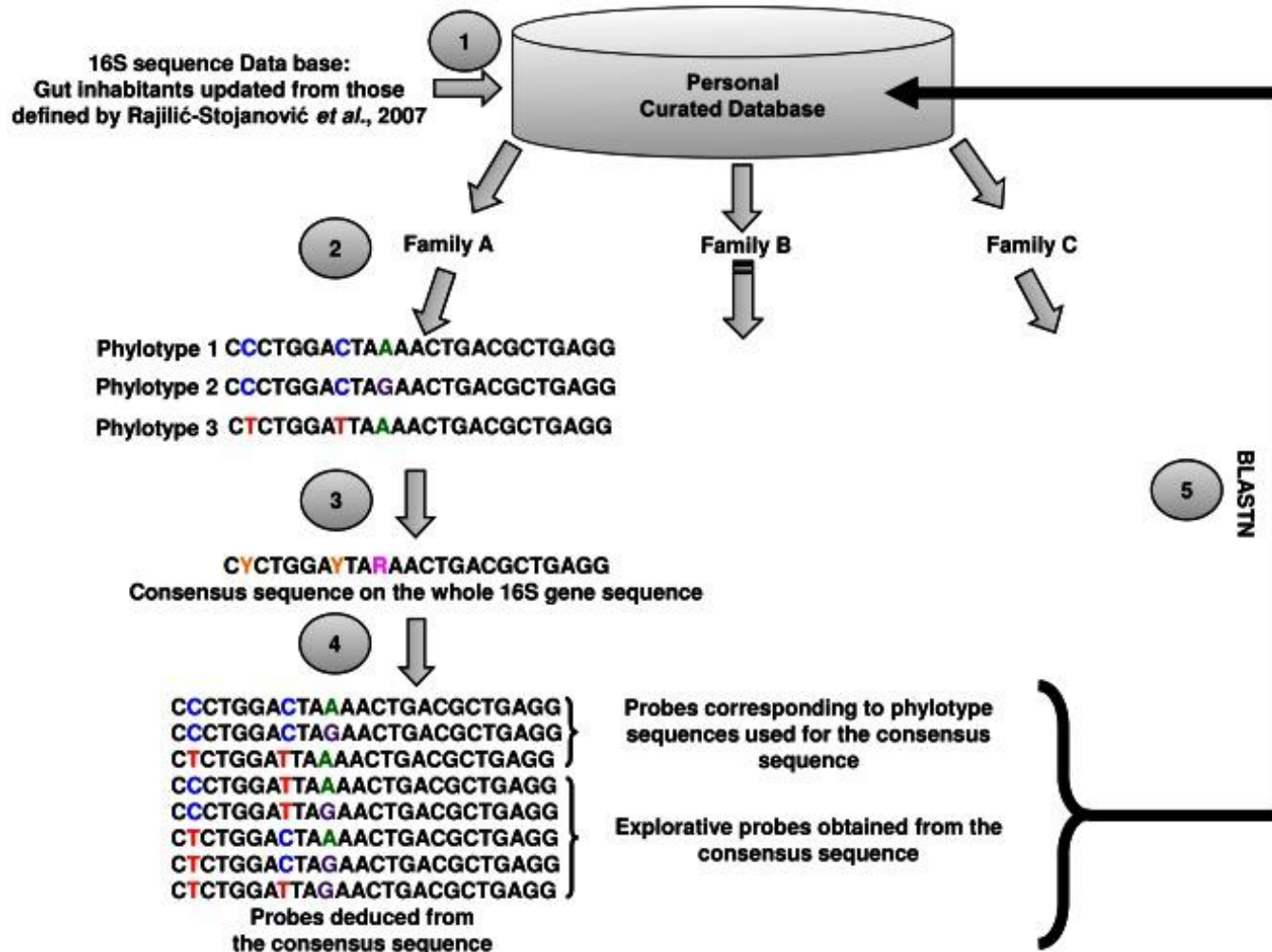
СПЕЦИФИЧНЫЕ

***Burkholderia* PhyloChip** – для выявления определенной группы (рода / вида) бактерий

Сравнительный анализ микробных сообществ кишечника пациентов во время антибиотикотерапии с использованием секвенирования филогенетических маркеров (141-149 клонов на образец) и филогенетических микрочипов показал, что в первом случае количество выявляемых бактериальных таксонов значительно ниже

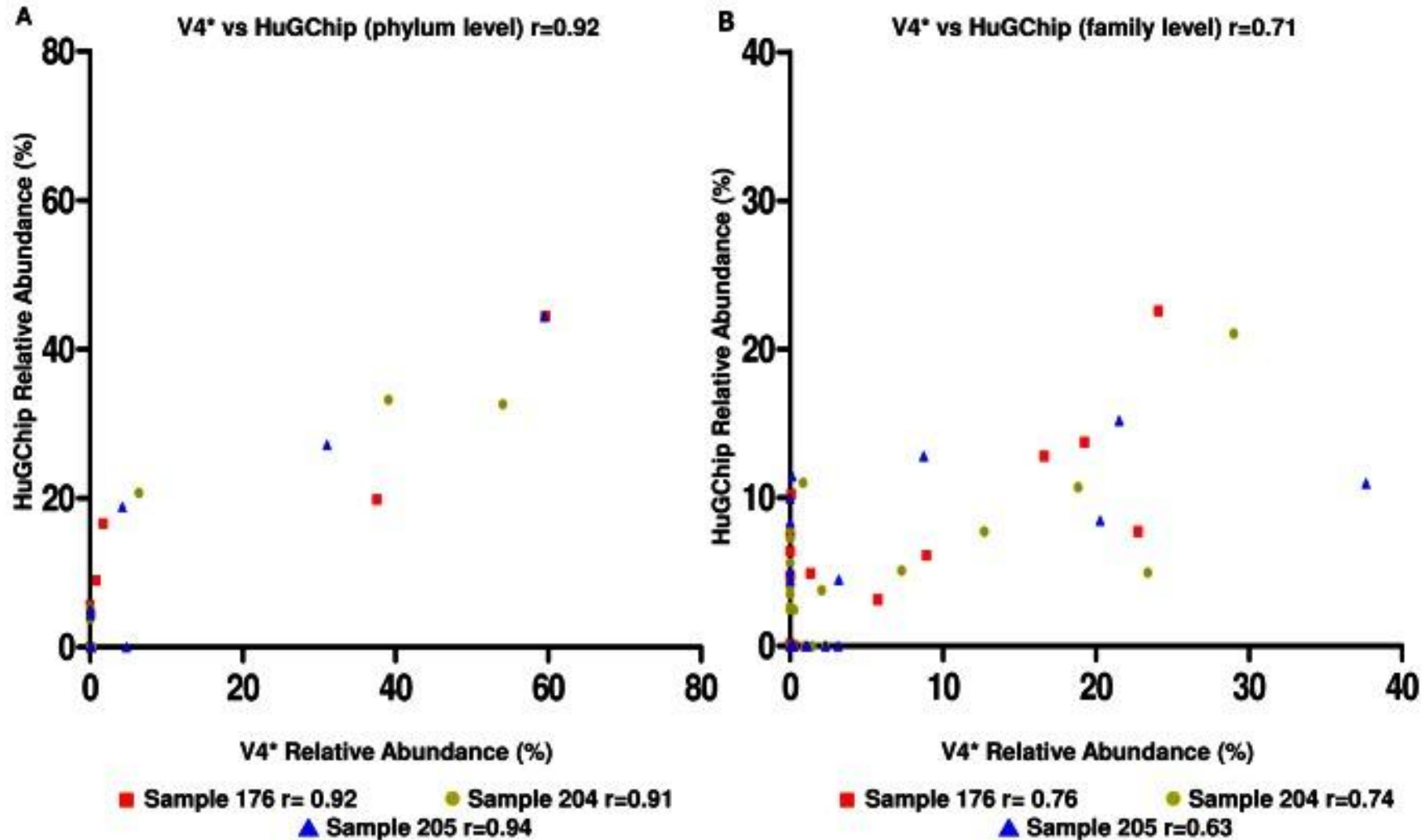
Flanagan JL , Brodie EL , Weng L , Lynch SV , Garcia O , Brown R , Hugenholtz P , DeSantis TZ , Andersen GL , Wiener-Kronish JP , et al. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa* . *J Clin Microbiol* 45 : 1954 – 1962 (2007).

Дизайн зонда для детекции микроорганизмов, обитающих в кишечнике человека



- (1) Создание базы данных (2) Выбор целевых таксонов и группирование последовательностей, принадлежащих одному таксону (3) Получение консенсусной последовательности гена 16S рНК для каждого таксона (4) Компьютерное моделирование возможных последовательностей таксон-специфичных олигонуклеотидных зондов (5) *In silico* проверка специфичности разработанных зондов

Сравнительный анализ кишечного микроба человека с использованием пиросеквенирования (область V4) и чипа HuGChip



Tottey W, Denonfoux J, Jaziri F, Parisot N, Missaoui M, et al. (2013) The Human Gut Chip “HuGChip”, an Explorative Phylogenetic Microarray for Determining Gut Microbiome Diversity at Family Level. PLoS ONE 8(5): e62544. doi: 10.1371/journal.pone.0062544

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР (ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ)

Определение количественного содержания конкретного микроорганизма (группы микроорганизмов) в образце

Детекция ампликонов в ПЦР-РВ:

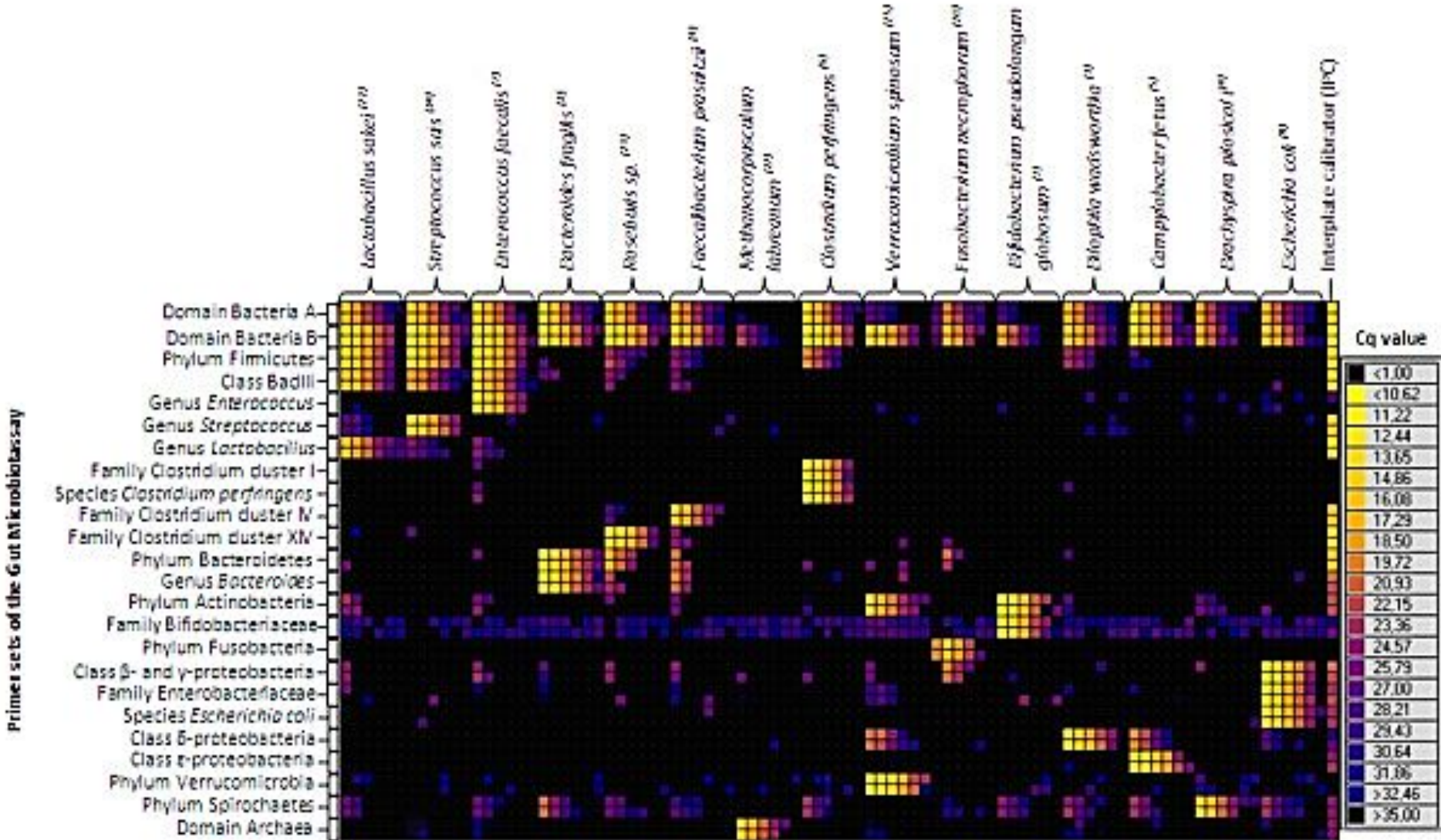
- ❑ Использование красителя, флуоресцирующего только когда он связан с двуцепочечной ДНК (SYBR Green);
- ❑ Использование специфичных зондов с флуоресцентной меткой

Варианты ПЦР-РВ:

- ❑ **TaqMan** – флуоресцентная метка на 5'-конце и «гаситель» флуоресценции на 3'-конце (эмиссия флуоресценции только после элонгации целевого фрагмента ДНК и высвобождения меченного 5'-конца)
- ❑ **Молекулярные маяки** – олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце гаситель флуоресценции (нефлуоресцирующий хромофор), а на 3'-конце флюорохром; нуклеотидные последовательности, прилежащие к красителям, самокомплементарны, в результате чего в молекуле формируется структура типа «стебель-петля», и флюоресценция флюорохрома подавлена. Область петли молекулярного маяка комплементарна анализируемому продукту полимеразной цепной реакции, после образования гибрида между ним и продуктом ПЦР флюорохром начинает флуоресцировать («маяк» загорается)

Анализ наличия определенных групп микроорганизмов в кишечнике человека с помощью ПЦР-РВ

Tenfold serial dilution of DNA extracted from reference bacteria (50 ng/μl – 0.50 μg/μl)



FISH – FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ *IN SITU*)

Принцип метода:

- ❖ Использование **флуоресцентно меченных олигонуклеотидных зондов**, комплементарных РНК *внутри* бактериальной клетки
- ❖ **Детекция результатов:**
 - флуоресцентная микроскопия (можно определить количество, морфологию и локализацию флуоресцентно меченных клеток – изучение взаимодействия с организмом-хозяина)
 - проточная цитометрия
- ❖ **Целевая молекула** – 16S рРНК (консервативна, постоянно присутствует в бактериальной клетке, интенсивный флуоресцентный сигнал)

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЗОНДОВ

детекция широкого спектра бактерий

Eub338

гибридизуется с большинством бактерий

детекция специфических групп бактерий

ALF

гибридизуется с альфа-протеобактериями

Определение состава кишечного микробиома пациентов после фекальной трансплантации

