Universiteit
Leiden
The Netherlands

Guardians of the gut: harnessing bioinformatics to study the gut microbiome and faecal microbiota transplantation in intestinal disorders

Nooij, S.

Citation

Nooij, S. (2025, October 10). *Guardians of the gut: harnessing bioinformatics to study the gut microbiome and faecal microbiota transplantation in intestinal disorders*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4262800

Version:	Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/4262800

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

幸

Appendix

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Het darmmicrobioom van de mens speelt een belangrijke rol in ziekte en gezondheid en wordt uitgebreid bestudeerd. Dit microbioom bestaat uit micro-organismen met uiteenlopende levenswijzen die bijvoorbeeld helpen bij de voedselvertering of toxines kunnen produceren. Deze micro-organismen, en met name bacteriën, worden doorgaans onderzocht door middel van DNA-sequencing. De DNA-sequencingtechnieken zijn de afgelopen decennia sterk verbeterd, waardoor het mogelijk is om sneller en nauwkeuriger DNA te analyseren. Hierbij wordt zoveel data gegenereerd, dat analyse alleen mogelijk is met behulp van computers. Dit wordt gedaan door gespecialiseerde 'computationele biologen' of bioinformatici: onderzoekers die kennis van de biologie combineren met computerwetenschappen. Met specialistische software verwerken zij steeds groter wordende datasets, veelal om nieuwe theoretische inzichten te verkrijgen die vervolgens in het laboratorium worden getoetst. Dergelijke technieken hebben er bijvoorbeeld toe geleid dat bepaalde bacteriën in het microbioom konden worden geassocieerd met darmziekten zoals colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn (samen bekend als *inflammatory bowel diseases* of IBD), met dikkedarmkanker, obesitas en de ziekte van Parkinson. Dit heeft meerdere aanknopingspunten geboden voor vervolgonderzoek naar de precieze rol van deze bacteriën en de biochemische mechanismen die daaraan ten grondslag liggen.

Voor een goede gezondheid is het belangrijk dat binnen het darmmicrobioom een zekere balans wordt gehandhaafd. Bij het gebruik van antibiotica raakt het microbioom verstoord, wat in ongunstige gevallen tot ziekte kan leiden. Dit is bijvoorbeeld het geval bij een (meervoudig) terugkerende *Clostridioides difficile*-infectie. *C. difficile* is een bacterieel pathogeen dat ernstige darminfecties kan veroorzaken en waar patiënten uiteindelijk zelfs aan kunnen overlijden. Deze *C. difficile*-bacterie produceert sporen die resistent zijn tegen antibiotica, waardoor een terugval (recidief) na een antibioticakuur mogelijk is. Dit kan zelfs meerdere keren achter elkaar gebeuren, waardoor een soort cyclus van antibioticabehandeling en infectie ontstaat. Na meerdere recidieven is een alternatieve therapie effectiever die juist gericht is op het falende microbioom: fecesmicrobiotatransplantatie (FMT). Door de darmbacteriën van een gezonde (ontlastings-)donor in de darmen van een patiënt met recidiverende *C. difficile*-infectie te brengen, wordt de balans in het darmmicrobioom hersteld, waardoor *C. difficile* niet opnieuw kan uitgroeien en geen toxines produceert. De cyclus stopt dan en er treedt geen nieuwe *C. difficile*-infectie op. Deze therapie is zo succesvol dat momenteel wordt onderzocht of FMT ook effectief is bij andere aandoeningen waarvan verondersteld wordt dat een verstoord microbioom een belangrijke rol heeft.

Het onderzoek in dit proefschrift is grotendeels gericht op FMT en de toepassing ervan bij terugkerende *C. difficile*-infecties en colitis ulcerosa. Het doel is om de bacteriële

gemeenschappen binnen donoren en patiënten in kaart te brengen om te bepalen welke invloed de transplantatie van het darmmicrobioom heeft gehad. Het proefschrift is opgedeeld in drie delen. Deel 1 gaat over FMT bij *C. difficile*-patiënten en de gunstige effecten van FMT op andere mogelijk schadelijke bacteriën. Deel 2 onderzoekt FMT bij colitis ulcerosa en hoe de bacteriële gemeenschap van de donor wordt opgenomen in de patiënt en hoe veranderingen in de samenstelling van deze bacteriën verband houden met de verlichting van ontstekingssymptomen. Deel 3 belicht *Ruminococcus gnavus*: een darmbacterie die veel voorkomt en waarvan verhoogde hoeveelheden geassocieerd worden met verschillende ziektebeelden, waaronder de ziekte van Crohn.

Deel 1: Aanvullende effecten van fecesmicrobiotatransplantatie

Naast het voorkomen van terugkerende infectie door *C. difficile*, veroorzaakt FMT veranderingen in het darmmicrobioom die ook op langere termijn gevolgen kunnen hebben. FMT voor recidiverende *C. difficile*-infectie is daardoor een interessant model om de gevolgen van het aanpassen van de microbiota te bestuderen. In dit eerste deel van het proefschrift worden twee studies beschreven die kijken naar de invloed van FMT op andere potentieel schadelijke bacteriën.

Hoofdstuk 2 richt zich op een bacterie die in verband is gebracht met de ontwikkeling van dikkedarmkanker: colibactine-producerende (*pks*$^+$) *Escherichia coli*. Wij hebben deze *E. coli*-variant gekwantificeerd in zowel gezonde fecesdonoren als in de met FMT behandelde patiënten. Door metagenoomdata te gebruiken konden wij zowel de aanwezigheid van deze specifieke bacterie bepalen als het hele microbioom in kaart brengen en zo het effect van FMT op deze bacterie beoordelen. Wij vonden *pks*$^+$ *E. coli* in de patiënten en in mindere mate ook in donoren. Na FMT kwam deze *E. coli* minder voor in patiënten, met name als de bijbehorende donor geen drager was van deze bacterievariant. Voor de overdracht van de *E. coli*-variant van donor naar patiënt hebben wij geen aanwijzingen gevonden. Samenvattend vonden wij dus een gunstig effect van FMT voor de patiënt door het dragerschap van een mogelijk kankerverwekkende bacterie te verlagen. Mogelijk kan deze bevinding in de toekomst bijdragen aan de ontwikkeling van preventieve microbiota-therapieën tegen darmkanker.

In hoofdstuk 3 hebben wij de invloed van FMT op antibioticaresistente bacteriën onderzocht. Hierbij hebben wij gebruik gemaakt van dezelfde metagenoomtechnieken als in hoofdstuk 2, aangevuld met het selectief opkweken van multiresistente bacteriën en het sequencen van hun DNA. Op deze manier konden wij de aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen en resistente bacteriestammen in kaart brengen in patiënten die FMT ontvingen en hun donoren. Op basis van de kweekresultaten bleek de prevalentie van multiresistente bacteriën omlaag te gaan na FMT. Middels *sequencing* konden wij echter aantonen dat deze bacteriën toch nog aanwezig kunnen zijn in het darmmicrobioom, maar slechts in zeer lage hoeveelheden. Ook andere antibioticaresistente bacteriën namen in aantal af na FMT, hoewel de diversiteit van

resistentiegenen onveranderd bleef. Van deze resistentiegenen hebben wij voorspeld welke afkomstig zijn van chromosomen en welke van plasmiden. Chromosomale resistentiegenen, die minder makkelijk worden uitgewisseld tussen bacteriën, verminderden in aantallen, terwijl resistentiegenen op plasmiden onverminderd aanwezig bleven. Dit leidt ons tot de conclusie dat FMT een effectieve methode is om antibioticaresistente bacteriën in aantallen te verlagen, wat mogelijk de kans op een moeilijk te bestrijden infectie met deze bacteriën vermindert. De resistente bacteriën verdwijnen echter niet volledig uit de darm. Mogelijk kan FMT worden ingezet bij patiënten met een verhoogd risico op infectie om de verspreiding van antibioticaresistentie in te dammen.

Deel 2: Microbiotaveranderingen na fecesmicobiotatransplantatie voor colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa is een vorm van IBD (*inflammatory bowel diseases,* of ontstekingsziekten van de darm) die zich uit in chronische ontstekingen in de dikke darm, waarbij ook een verstoring in de microbiota wordt gezien. In een gerandomiseerde klinische studie hebben wij onderzocht of het veilig is om FMT toe te dienen aan colitis ulcerosapatiënten en in hoeverre de donorbacteriën koloniseren in de darm van de patiënt; een proces dat wordt aangeduid met 'engraftment'. De patiënten werden voorbehandeld met ofwel de ontstekingsremmer budesonide, of met een placebo. Middels metagenomics van ontlastingsmonsters is wederom de darmmicrobiota gekarakteriseerd.

Hoofdstuk 4 beschrijft de klinische studie en bacteriële engraftment met een zelf ontwikkelde maat op basis van verschillende microbiotadiversiteitsparameters. In tegenstelling tot onze verwachting vonden wij dat niet budesonide de engraftment bevorderde, maar dat er een verschil in engraftment was tussen microbiota van twee donoren. Dit benadrukt het belang van verder onderzoek naar donorselectie om colitis ulcerosa effectief met FMT te kunnen behandelen.

Hoofdstuk 5 duikt dieper in de microbiële ecologie om de bevindingen van hoofdstuk 4 in een ander perspectief te plaatsen. Dit onderzoek heeft gepoogd verschillende samenstellingen en veranderingen van darmmicrobiota te correleren aan klinische remissie: het verminderen van colitis ulcerosa-ontstekingen. Middels computermodellen hebben wij clusters van microbiotaprofielen geanalyseerd en vonden één cluster dat sterk samenhing met een slechte uitkomst: het uitblijven van remissie. Een ander cluster, gekenmerkt door hoge hoeveelheden *Ruminococcaceae* en *Lachnospiraceae*, kwam juist vaker voor bij patiënten bij wie de behandeling aansloeg. Deze modellen kunnen helpen om al in een vroeg stadium van de behandeling te voorspellen hoe effectief deze zal zijn.

Hoofdstuk 6 borduurt voort op de bevindingen van de voorgaande twee hoofdstukken en combineert een analyse van engraftment en ecologische dynamiek van de

microbiota bij patiënten vóór de FMT. Op deze manier zochten wij het antwoord op de vraag: hoe hangt de dynamiek tussen bacteriën van donor en patiënt samen met behandelsucces? Bacteriën die al in hoge mate aanwezig waren in de patiënten persisteerden vaak na FMT. De mate van engraftment van donorbacteriën bleek een indicator voor behandelsucces. Een lage mate van stabiele engraftment hing samen met klinisch succes, terwijl hoge mate van kortstondige kolonisatie van donorsoorten vaak voorkwam in patiënten die opnieuw ontstekingen kregen. Samenvattend suggereren onze bevindingen dat het behandelsucces afhangt van 1) de veerkracht van het darmmicrobioom van de patiënt, én van 2) de capaciteit om microbiota van de gezonde donor stabiel op te kunnen nemen.

Deel 3: Wereldwijde verspreiding en genoombiologie van darmbacterie *Ruminococcus gnavus*

Hoofdstuk 7.1 draait om *Ruminococcus gnavus*: een darmbacterie die nauw geassocieerd is met IBD en met name de ziekte van Crohn. Tegelijkertijd komt deze bacteriesoort voor in de darmen van een groot deel van de gezonde bevolking. Ons doel was om deze schijnbare tegenstelling te onderzoeken in een meta-analyse (een samenvatting en heranalyse van reeds gepubliceerde studies) over de wereldwijde verspreiding van *R. gnavus*. Daarnaast hebben wij gepoogd de genomische achtergrond van deze tweedeling te ontrafelen om meer inzicht te krijgen in de interacties tussen gastheer en microbe. Uit onze data blijkt dat *R. gnavus* inderdaad meer en vaker voorkomt bij IBD patiënten, maar ook bij andere aandoeningen zoals type-2 diabetes, hoge bloeddruk, en hart- en vaatziekten. Bovendien zagen we dat *R. gnavus* meer voorkomt in Westerse gemeenschappen dan in niet-Westerse, en vaker bij baby's en jonge kinderen dan bij volwassenen. We vonden dat de genomen van *R. gnavus*-stammen uit gezonde mensen zijn te onderscheiden van stammen die geïsoleerd zijn uit Crohnpatiënten. Dit duidt erop dat er verschillende ondersoorten bestaan die zich elk hebben aangepast aan, of samen zijn geëvolueerd met, een andere gastheerniche. Ons onderzoek onderstreept dat er binnen een enkele bacteriesoort belangrijke verschillen kunnen bestaan. Bij microbioomonderzoek is het daarom belangrijk om deze nuances in acht te nemen bij het koppelen van bacteriën aan ziektebeelden.

Hoofstuk 7.2, tot slot, vloeit voort uit het werk in hoofdstuk 7.1, en beschrijft de reconstructie van volledige genomen van bacteriën die vermoedelijk per ongeluk in onze monsters van gezuiverde *R. gnavus* terecht zijn gekomen (contaminanten). Deze onverwachte bevinding leidde tot de reconstructie van zeventien *Streptococcus*-genomen, één genoom van *Bacteroides fragilis* en één van *Staphylococcus capitis*. Door de gebruikte sequencingmethode met lange DNA-fragmenten zijn deze genomen buitengewoon compleet. Ondanks de onduidelijke herkomst van deze bacteriën willen wij, als aanhangers van FAIR data en Open Science, deze hoogwaardige data graag delen met de wetenschappelijke gemeenschap.

Conclusies en toekomst van microbiotatherapieën

Het onderzoek in dit proefschrift heeft geleid tot nieuwe inzichten in FMT, de effecten op het darmmicrobioom van haar ontvangers en hoe dit samenhangt met de behandeling van recidiverende *C. difficile*-infecties en colitis ulcerosa. Daarnaast hebben wij nieuwe kennis opgedaan over de veelbesproken maar weinig onderzochte darmbacterie *R. gnavus*. De opgedane kennis kan bijdragen aan een verbeterd begrip van microbiotabehandelingen en creëert een groter bewustzijn van mogelijke gezondheidsrisico's op de lange termijn. Dit benadrukt dan ook het belang van het bijhouden van gegevens over FMT in zogenaamde registers, zodat zeldzame bijwerkingen kunnen worden gedetecteerd, begrepen en in de toekomst wellicht voorkomen.

Ondanks onze toegenomen kennis, blijft het een uitdaging om precies te bepalen welke bacteriën sleutelrollen vervullen in de ontwikkeling of juist behandeling van de verschillende ziekten die samenhangen met het darmmicrobioom. Voor *C. difficile* zijn al verschillende *live biotherapeutic products* (LBP) op de Amerikaanse markt of in een ver stadium van klinische studies. Deze producten bestaan vaak uit mengsels van darmbacteriën van gezonde donoren, al dan niet geïsoleerd en in consortia samengebracht. Voor complexere ziekten zoals IBD zijn soortgelijke LPB's nog in ontwikkeling. De verwachting is dat deze als geneesmiddel geregistreerde producten op termijn FMT kunnen vervangen. Echter, tot die tijd zijn studies met FMT zeer waardevol om ons begrip van het darmmicrobioom te vergroten en de rol daarvan in gezondheid en ziekte.