Metagenomische Sequenzierung des humanen Darmmikrobioms vor und 3 Monate nach bariatrischer Chirurgie bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus: Korrelation mit inflammatorischen und metabolischen Parametern

J. Gräßler[1], Y. Qin[2], H. Zhong[2], J. Licinio[3], M. Ehrhart-Bornstein[1], T. Lohmann[4], T. Wolf[4], S.R. Bornstein[1]

[1]Universitätsklinikum CGC der TU Dresden, Medizinische Klinik und Poliklinik III

[2] BGI Shenzhen, VR China; [3]John Curtin School Med. Res., Canberra, Australien

[4]KH Dresden Neustadt, Interdisziplinäres Adipostas Zentrum

Gegenstand

Roux-en-Y-Magenbypass (RYMB; **Abb. 1**) ist eine wichtige therapeutische Option zur Langzeitbehandlung für krankhaft adipöse Patienten mit Type-2 Diabetes mellitus (T2D). Wechselwirkungen und pathogenetische Folgen der durch RYMB ausgelösten Effekte auf Stoffwechsel und Darmmikrobiom werden bisher nur unzureichend verstanden.
Ziel der Studie war es, intra-individuelle Veränderungen der Darmmikroflora nach RYMB mittels metagenomischer Sequenzierung zu charakterisieren und mit klinischen Daten zu assoziieren.

Material und Methoden

Stuhl- und Nüchternblutproben von 6 Patienten mit BMI>40 kg/m² wurden vor und 3 Monate nach RYMB genommen. Die klinischen Basisdaten sind in **Tab. 1** dargestellt. Blutproben für Hormonbestimmungen wurden sofort zentrifugiert und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Stuhlproben wurden mittels Papierstuhlfängern gewonnen, in sterile Stuhlröhrchen überführt und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Zur DNA-Präparation wurden 200 mg Stuhl in 250 µl Guanidinthiocyanat und 40 µl N-Lauroylsarcosin aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer Schwingmühle MM400 der Firma Retsch, Haan (**Abb. 2**). Konstruktion der DNA-Bibliotheken und Sequenzierung wurden mit Illumina Kits realisiert (Details in [1]). Pro Stuhlprobe wurden ca. 3,1-3,9 Gbp sequenziert und mit Datenbanken abgeglichen.
Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianz- und Korrelationsanalysen.

Ergebnisse

- Basierend auf relativen Genhäufigkeiten wurden 1061 verschiedene Spezies, 729 Gattungen, 44 Stämme und 5127 funktionelle Gene (KEGG Orthologien; KO) identifiziert.
- Trotz der hohen Keimdiversität konnten die meisten der Bakterien 7 bakteriellen Stämmen zugeordnet werden (**Abb. 3**). RYMB-induzierte Veränderungen wurden durch einen relativen Abfall von Firmicutes und Bacteroidetes und einen Anstieg von Proteobakterien geprägt (**Abb. 3**).
- Infolge des RYMB veränderten sich die relativen Häufigkeiten von 22 Spezies signifikant (**Tab. 2**), die nachfolgend einer Hauptkomponentenanalyse und Korrelationsanalysen unterzogen wurden.
- Mittels der Hauptkomponentenanalyse (Eigenvalue > 2,5, Varimax Rotation mit Kaiser-Normalisierung; Gesamtvarianzaufklärung: 63,0%: Faktor 1: 35,4%, Faktor 2: 27,6%) konnten stark miteinander korrelierende Spezies in 2 Faktoren zusammengefasst werden (**Tab. 3**).
- Faktor 1 wurde durch den Anstieg der relativen Häufigkeit des Proteobacteriums Enterobacter cancerogenus und dem Abfall der Firmicutes Faecalibacterium prausnitzii und Coprococcus comes determiniert (**Tab. 3**). Insgesamt korrelierten 5 der 11 Spezies in Faktor 1 direkt mit BMI und CRP (**Tab. 3**). Zusätzlich korrelierten 3 Spezies ausschließlich mit BMI und eine Spezies nur mit CRP. Im Gegensatz dazu korrelierte E. Cancerogenus invers mit BMI und CRP (**Tab. 3**).
- Die Spezies in Faktor 2 korrelierten schwächer mit BMI und CRP (2/11) (**Tab. 3**).
- Eine Spearman-Rangkorrelationsanalyse zeigte eine direkte Assoziation von 6 bakteriellen Spezies mit den Plasmaspiegeln von Gesamtcholesterol (TC) und LDL-Cholesterol (LDL-C) (**Abb. 4**). Vier bakterielle Spezies korrelierten invers mit TC und LDL-C (**Abb. 4**). Darüber hinaus korrelierten 2 Spezies direkt und 2 invers mit Plasmatriglyceriden (TG). Faecalibacterium prausnitzii korrelierte direkt mit Nüchternblutglucose (**Abb. 4**).

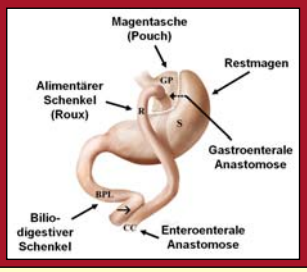

Abb.1: Illustration des Roux-en-Y-Magenbypass

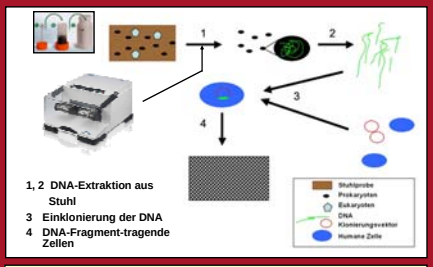

Abb.2: Metagenomischer Workflow

	Op-status	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Sex		Male	Male	Female	Male	Female	Female
Age (years)		53	46	42	38	49	53
BMI (kg m^{-2})	Before	52.1	40.9	49.0	48.5	43.9	42.1
	3 Months after	42.3	34.5	41.5	37.1	33.8	28.7
RR systolic (mm Hg)	Before	180	140	144	135	140	173
	3 Months after	125	120	125	120	130	130
RR diastolic (mm Hg)	Before	110	100	98	80	90	90
	3 Months after	80	80	80	80	80	80
Triglycerides (mM)	Before	1.21	1.68	3.09	6.48	1.96	4.06
	3 Months after	1.47	1.27	1.47	2.08	1.08	0.90
Total cholesterol (mM)	Before	5.34	5.22	6.00	7.04	4.92	6.71
	3 Months after	4.59	3.98	5.20	5.44	4.33	4.70
LDL-cholesterol (mM)	Before	3.50	3.22	3.70	4.20	3.01	3.91
	3 Months after	2.73	2.48	3.42	3.55	2.66	2.90
HDL cholesterol (mM)	Before	0.95	1.15	1.30	1.10	1.23	1.30
	3 Months after	1.05	1.10	1.24	0.73	1.14	1.56
Diabetes status	Before	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
	Since	1989		2006	2009	2006	2010
Diabetes medication	Before	Insulin	NA	Metformin	Metformin	Metformin	Metformin
	3 Months after	Insulin	NA	Metformin	Diet	Diet	Diet
HbA_{1c} (%)	Before	6.7	5.2	5.4	9.0	6.2	6.7
	3 Months after	6.6	5.1	5.5	7.2	6.0	6.2
Plasma glucose (mM)	Before	6.24	6.06	4.42	6.82	7.92	4.77
	3 months after	8.75	4.97	3.87	4.81	5.52	5.04
Plasma cortisol (nM)	Before	374	99	233	171	205	79
	3 Months after	176	370	136	304	220	168

Abbreviations: BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NA, not applicable.

Tab.1: Patienten - Grundcharakteristik

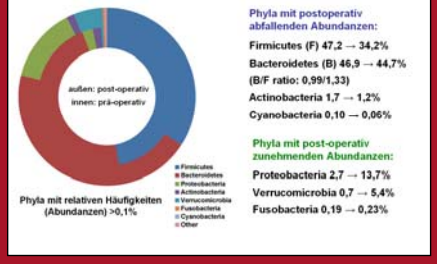

Abb.3: RYMB-induzierte Taxonomie-Effekte

	Spezies	vor RYMB	nach RYMB	Signifikanz	Delta
1	Enterobacter cancerogenus	0.808×10^1	16.902×10^1	0.002	↑ (20x)
2	Treponema pallidum	10.743×10^1	2.361×10^1	0.011	↓
3	Mycobacterium kansasii	7.137×10^1	1.872×10^1	0.012	↓
4	Faecalibacterium prausnitzii	0.103	0.031	0.013	↓
5	Coprococcus comes	11.046×10^1	4.649×10^1	0.018	↓
6	Clostridium spiroforme	1.205×10^1	0.549×10^1	0.020	↓
7	Brachyspira hyodysenteriae	1.720×10^1	1.032×10^1	0.022	↓
8	Lactobacillus reuteri	6.368×10^1	3.275×10^1	0.023	↓
9	Anaerostipes caccae	2.497×10^1	1.726×10^1	0.025	↓
10	Pseudomonas mendocina	1.570×10^1	0.561×10^1	0.026	↓
11	Fusobacterium periodonticum	5.942×10^1	3.450×10^1	0.030	↓
12	Thermomicrobium roseum	3.153×10^1	1.953×10^1	0.034	↓
13	Veillonella parvula	4.077×10^1	11.559×10^1	0.035	↑ (1,8x)
14	Veillonella dispar	1.661×10^1	10.499×10^1	0.038	↑ (5,3x)
15	Shigella boydii	0.891×10^1	42.29×10^1	0.039	↑ (46x)
16	Leptospira interrogans	5.091×10^1	1.942×10^1	0.040	↓
17	Salmonella enterica	0.978×10^1	7.368×10^1	0.043	↑ (6,5x)
18	Staphylococcus epidermidis	3.068×10^1	1.490×10^1	0.044	↓
19	Nakamurella multipartita	2.431×10^1	1.074×10^1	0.045	↓
20	Lactobacillus acidophilus	2.379×10^1	0.816×10^1	0.045	↓
21	Acinetobacter johnsonii	8.420×10^1	1.384×10^1	0.046	↓
22	Fibrobacter succinogenes	7.765×10^1	5.259×10^1	0.046	↓

Tab.2: Signifikante RYMB-induzierte Effekte auf das Metagenom

	Component 1	Component 2	Spearman correlation BMI r	BMI P	CRP r	CRP P
	Factor loading					
L. acidophilus	0.920		0.574	0.050	0.629	0.028
F. succinogenes	0.885		0.692	0.013	0.804	0.002
Nakamurella multipartita	0.866		0.399	0.199	0.357	0.253
C. comes	0.837		0.678	0.015	0.713	0.009
F. prausnitzii	0.787		0.727	0.007	0.741	0.006
L. reuteri	0.740		0.580	0.048	0.566	0.055
A. johnsonii	0.687		0.713	0.009	0.517	0.083
M. kansasii	0.678		0.945	0.067	0.329	0.297
E. cancerogenus	−0.638		−0.755	0.005	−0.608	0.036
S. epidermidis	0.587		0.538	0.071	0.622	0.031
T. pallidum	0.541		0.634	0.027	0.634	0.027
L. interrogans		0.850	0.252	0.430	0.042	0.897
F. periodonticum		0.846	0.217	0.499	0.028	0.931
P. mendocina		0.839	0.196	0.542	−0.007	0.983
B. hyodysenteriae		0.721	0.517	0.085	0.147	0.649
S. boydii		−0.700	−0.340	0.280	−0.214	0.505
V. parvula		−0.676	−0.503	0.095	−0.350	0.265
S. enterica		−0.647	−0.189	0.557	−0.105	0.746
V. dispar		−0.597	−0.741	0.006	−0.573	0.051
T. roseum		0.544	0.650	0.022	0.692	0.013
C. spiroforme		0.528	0.503	0.095	0.599	0.059
A. caccae		0.523	0.420	0.175	0.531	0.075

Tab.3: Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse signifikant veränderter Spezies nach RYGB und deren Korrelation mit Body-Mass-Index (BMI) und C-reaktivem Protein (CRP)

Abb.4: Rank-Korrelationen RYMB-induzierter Metagenomeffekte mit metabolischen Blutparametern
TC: Gesamt-Cholesterol; LDL-C: LDL-Cholesterol; TG: Triglyceride; Glucose: Plasma-Glucose

Schlussfolgerung

Drei Monate nach RYMB konnte ein signifikanter Anstieg von Gammaproteobacterien (E. cancerogenus, Salmonella enterica, Shigella boydii) und Veillonellen bei gleichzeitigem Abfall verschiedener Spezies der Firmicutes und Bacteroidetes nachgewiesen werden. Spezies mit ansteigenden relativen Häufigkeiten korrelierten invers, Spezies mit abfallenden relativen Häufigkeiten direkt mit abfallenden Cholesterol- und Triglyceridwerten. Die verminderte relative Häufigkeit von Faecalibacterium prausnitzii korrelierte direkt mit Nüchternblutglucose.

Diese Daten belegen eine enge Assoziation zwischen den tiefgreifenden und spezifischen intraindividuellen Modifikationen des Darmmikrobioms nach RYMB und dem sich deutlich verbessernden metabolisch-inflammatorischen Status der Patienten.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse können neue präventive, diagnostische und therapeutische Strategien konzipiert werden.

Literatur

[1] Graessler J et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. Pharmacogenomics J. 2012

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN