

**Co nového v přírodních vědách?****Projekt lidského mikrobiomu**

DARINA ČEJKOVÁ, DAVID ŠMAJS

Úplné přečtení sekvence lidského genomu (Human Genome Project, HGP) v roce 2004 nastartovalo celou řadu následných projektů, které se zaměřují jak na funkční mapování lidského genomu (s cílem určit, jakou konkrétní funkci mají jeho části), tak také na projekty studující míru příbuznosti člověka s jeho nejbližšími příbuznými, na projekty studující genetickou podstatu nádorových onemocnění a na projekty studující genetickou variabilitu současného lidstva, tudíž i individuální vnímavost a individuální průběh různých chorob (viz také Universitas 41, 2008/01).

Zdravé lidské tělo je osídleno mnoha různými symbiotickými mikroorganismy, a to na nejrůznějších svých místech. Ačkoliv úhrnná hmotnost těchto mikroorganismů tvoří jen 1-2 % hmotnosti člověka, počet buněk těchto symbiontů přesahuje počet lidských buněk nejméně desetinásobně. Odhaduje se, že jen v lidském střevě žije asi tisíc bakteriálních druhů a asi sedm tisíc individuálních bakteriálních kmenů. Toto společenství mikrobů se mimo jiné podílí na přeměně živin, na syntéze vitaminů, metabolismu cizorodých látek (např. léčiv), na stimulaci obnovování střevního epitelu, stimulaci imunitního systému atp. Soubor všech těchto mikroorganismů žijících v lidech a na nich označujeme jako lidský mikrobiom. Na člověka tak může být nahlíženo jako na superorganismus obsahující jak eukaryotické, tak i prokaryotické geny a jehož metabolické schopnosti jsou dány jak jeho lidskou, tak také jeho mikrobiální metabolickou složkou.

Projekt lidského mikrobiomu (Human Microbiome Project, HMP) je logickým pokračováním projektu lidského genomu a je bohatě sponzorován americkým NIH (National Institute of Health, „Národní ústav zdraví“) ve čtyřech amerických sekvenačních centrech (evropská účast na projektu HMP je ještě menší než v případě projektu HGP), zahrnujících Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX; The Genome Center at Washington University, Saint Louis, MO; The J. Craig Venter Institute, Rockville, MD; Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA. Kromě toho probíhá celá řada pilotních projektů, které mají za cíl zjistit případný podíl lidského mikrobiomu na několika vybraných lidských onemocněních. Seznam chorob a jejich příznaků, u kterých se předběžně uvažuje o podílu lidského mikrobiomu na jejich vývoji, je uveden v tabulce 1.

Na rozsah projektu lidského mikrobiomu můžeme usuzovat z toho, že odhadovaný počet prokaryotických (mikrobiálních) genů lidského mikrobiomu převyšuje počet genů lidských asi stonásobně (přítom člověk má asi 20-25.000

genů). Navíc je třeba lidský mikrobiom vyšetřit u mnoha jedinců a na mnoha místech lidského těla, a to opakovaně, v mnoha časových intervalech a také za různých fyziologických a patologických stavů.

K pochopení genetické a fyziologické rozmanitosti lidského superorganismu musí být charakterizován lidský mikrobiom i faktory, které ovlivňují jeho vývoj a rozšíření v těle člověka i na něm. Očekávané výstupy HMP mohou zodpovědět též otázky týkající se současné mikroevoluce, tedy zda a jak rychle dochází ke změně mikrobiomu s nástupem nových výrobních i spotřebních technologií a z nich vyplývající přeměny biosféry a životního stylu. A také jak se s touto změnou mikrobiomu mění zdraví a ev. predispozice k chorobám. Francis S. Collins, dřívější vedoucí světového projektu HGP a současný předseda NIH, definuje hlavní cíle tohoto projektu takto: „Je třeba zjistit, které mikroorganismy žijí na různých místech lidského těla, a prozkoumat, jak se liší jejich zastoupení v případech zdravých a nemocných jedinců. Navíc předpokládáme, že najdeme řadu nových mikrobiálních genů a mikrobiálních funkčních elementů, které změní náš přístup k biologii člověka.“

#### Orgánová soustava

kůže

#### choroba/příznak

lupenka (psoriasis)

akné

atopická dermatitida

trávicí trakt

obezita

Crohnova choroba

jjicnový adenokarcinom

nekrotizující enterokolitida

ulcerózní kolitida

syndrom dráždivého tračníku

urogenitální trakt

bakteriální vaginóza

sexuálně přenosné choroby

kombinace orgánových systémů

imunodeficiencie

horečnaté stavy

**Tabulka 1.** Seznam chorob a příznaků, u kterých je předběžně uvažováno o podílu lidského mikrobiomu na jejich vývoji.

## Co už víme o lidském mikrobiomu

V minulosti se mikrobiologové věnovali převážně získávání poznatků o jednotlivých mikroorganismech, a to přednostně těch, které bylo možno snadno kultivovat v laboratorních podmínkách, nebo těch, které způsobovaly infekční onemocnění. Až s příchodem nových molekulárně-biologických technologií (zejména nových sekvenačních metod) bylo možné obrátit pozornost

ke studiu veškeré genetické informace mikrobiomu, k tzv. metagenomu. Odhaduje se, že asi polovinu všech mikroorganismů z lidského mikrobiomu nelze kultivovat při použití současných laboratorních postupů, a tak je vyšetření jejich genetické informace zatím jediným dostupným a efektivním přístupem k jejich studiu.

Jedna z prvních rozsáhlejších studií lidského mikrobiomu se týkala bakterií ve fekálních vzorcích dvou zdravých dospělých jedinců. Tato studie identifikovala v traktu tlustého střeva 237 různých mikroorganismů z obou skupin (domén) prokaryotických organismů (tj. z domény Archaea a domény Bacteria). Převládající druhy patřily ke kmeni *Firmicutes* (44 %) a k rodu *Bacteroides* (55 %). Výsledky ukázaly, že u zdravého jedince střevo obsahuje bakterie, které se podílejí na metabolismu xenobiotik (tj. cizorodých látek), cukrů a aminokyselin. Navíc tyto bakterie produkují metan a syntetizují vitaminy a izoprenoidy (např. steroidy). Tato studie také potvrdila, že bakterie produkují enzymy, které jsou nutné pro zpracování různých druhů cukrů, které lidský organismus sám o sobě metabolizovat nedokáže. Pozdější studie ukázala, že poměr mikroorganismů patřících ke kmeni *Firmicutes* a rodu *Bacteroides* se s věkem člověka výrazně mění.

Jiná studie ukázala, že obezita myši je ovlivněna složením mikrobiálních populací v jejich střevě. Výzkum byl prováděn na myších s nefunkčním genem pro tvorbu leptinu. Leptin je bílkovina, která se podílí na udržování energetické rovnováhy, omezuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej. Bylo zjištěno, že obézní myši mají vyšší procentuální zastoupení bakterií kmene *Firmicutes* oproti myším zdravým. V mikrobiomu obézních myši byla odhalena vyšší přítomnost genů kódujících proteiny, umožňující zpracování některých cukerných složek, které jsou tak k dispozici pro buňky hostitelského organismu. Navíc se podařilo prokázat, že mikrobiomem z jednoho organismu můžeme „infikovat“ jiný organismus. Pokud přeneseme mikrobiom z obézní myši do myši neobézní, přenesený mikrobiom bude opět vykazovat vyšší přítomnost zástupců kmene *Firmicutes*, a tedy i změnu ve vstřebávání potravy. Současná epidemie obezity v západním světě tak může mít i svou infekční složku.

Další studie mapovala bakteriální komunitu pokožky. Pokožka (povrchová vrstva kůže) je jedním z největších orgánů v těle a působí jako ochrana před patogenními mikroorganismy. Výzkumu se zúčastnilo 10 jedinců, jejichž mikrobiom byl setřen z 20 rozličných míst pokožky. Tato místa lze pro přehlednost rozdělit do 3 skupin: na místa suchá (např. předloktí), místa s vyšším výskytem mazových žláz (např. *glabella*) a místa s vysokou vlhkostí (např. podpažní jamka). V místech s největší vlhkostí převládaly druhy korynebakterií (z kmene *Actinobacteria*) a stafylokoků (*Firmicutes*). Místa s vyšším výskytem mazových žláz jsou nejčastěji obsazena zástupci propionibakterií a stafylokoky. Naopak na suchých místech se nejčastěji setkáme s kmeny třídy *Betaproteobacteria* a řádu *Flavobacteriales*. S odstupem půl roku po prvním odběru byl odebrán druhý stěr. Mikrobiom nejpodobnější k prvnímu stěru se udržel v místech vnějšího zvukového kanálu, ve slabinách, v záhybu kolem nosních

direk a uvnitř nich. Naopak nejvyšší variabilita byla pozorována v podkolenní jamce, předloktí a na hýždí.

Obečně vzato, interpersonální rozdíly ve složení kožního mikrobiomu z jednoho místa jsou menší než rozdíly mikrobiomu z různých míst těla jedné osoby. Naopak interpersonální rozdíly ve složení gastrointestinálního mikrobiomu jsou značné a mnohem větší, než přináší jeho změna v průběhu času u téhož jedince. Ve srovnání s tímto mikrobiomem je mikrobiom pokožky v čase vysoce variabilní. Tyto a výše zmíněné výzkumy naznačují skutečnost, že převládající lidská mikroflóra je nejen místně specifická, ale také značně dynamická. K obměně dochází v některých místech častěji, v jiné lokalitě jen vzácně. Interpretace získaných výsledků však zatím není vždy jednoduchá a jednoznačná.

## Jaké jsou tedy cíle projektu lidského mikrobiomu

K zodpovězení základních otázek týkajících se lidského zdraví musíme nejprve definovat, co lze považovat za normální stav (tedy zdraví) a co už za stav abnormální (tedy nemoc). K poznání normálního lidského mikrobiomu by měla sloužit studie vyšetřující 250 zdravých osob různého věku, rasy a pohlaví. Těmto dobrovolníkům budou odebrány vzorky z 15 (u mužů) nebo 18 (u žen) míst lidského těla. Tato místa můžeme shrnout do pěti větších orgánových celků, a to do lidské pokožky, gastrointestinálního traktu, urogenitálního traktu, ústní dutiny a nosní sliznice. Hlavním metodickým přístupem bude sekvenace vybraných krátkých úseků 16S rDNA. Tato DNA (kódující ribosomální RNA) je dostatečně konzervativní, abychom pro její vyšetření mohli uplatnit univerzální přístup amplifikace i sekvenace její molekuly, ale i dostatečně variabilní, aby bylo možné podle ní rozlišit jednotlivé druhy nebo rody bakterií. Protože tento přístup nevystihuje spleť celého mikrobiálního systému dané lokality těla, bude použit také princip náhodného sekvencování veškerého genetického materiálu (DNA). Na základě studia sekvencí DNA budou v mikrobiomu definovány bakteriální metabolické dráhy, které v dané lokalitě lidského těla probíhají nebo mohou probíhat (což lze rozlišit paralelním studiem celkové RNA izolované z příslušného vzorku).

Lidský mikrobiom není charakterizován jen bakteriálními buňkami, ale také viry a dalšími eukaryotickými symbionty a parazity, např. červy, plísněmi apod. I na zkoumání jejich přítomnosti je HMP zaměřen.

Hlavními záměry projektu lidského mikrobiomu je pak zjistit:

1. nakolik je lidská mikroflóra stabilní a proměnná v čase (např. v průběhu dne a v průběhu celého individuálního života jedince),
2. nakolik jsou si vzájemně podobné mikrobiomy u členů rodiny eventuálně u členů určitého lidského společenstva a nakolik se tyto mikrobiomy liší od mikrobiomů pocházejících z jiných lidských společenství,
3. zda lze definovat základní mikrobiom společný všem lidem, jak je získáván a přenášen.

4. co ovlivňuje genetickou diverzitu mikrobiomu a jak se mění mikrobiom za různých fyziologických a patologických podmínek.

Vedle studia zdravých dobrovolníků se HMP zabývá i studiem nemocných. V letošním roce bylo vybráno a finančně podpořeno 15 pilotních metagenomických projektů týkajících se např. vaginálních infekcí, Crohnovy choroby, akné, nekrotizující enterokolitidy u novorozenců, virových infekcí u jedinců infikovaných virem HIV (viz také tabulka 1).

Kromě nároků na biomedicinské aplikace jsou neméně důležité požadavky kladeny i na jiná odvětví doprovázející HMP. Především jde o vývoj nových technologických a informačních prostředků, které napomohou splnění cílů projektu. Důraz je kladen především na hodnocení a interpretaci velmi krátkých úseků DNA a hledání jejich příbuznosti se známými daty, nalezení statistických metod pro porovnání mikrobiomů z různých vzorků, např. z různých míst lidského těla, nebo vzorků získaných od pacientů s různými onemocněními apod. Výzvou pro biology je také vývoj kultivačních metod pro dosud nekultivovatelné organismy. Jde především o semianaerobní mikroorganismy žijící poblíž slizniční vrstvy tlustého střeva, které vyžadují méně kyslíku než bakterie aerobní a více než bakterie anaerobní.

Neodmyslitelnou součástí HMP jsou diskuse o etických, právních a sociálních konsekvencích, které s sebou tento projekt nese, např. definice pojmů „já“, „normální“, „abnormální“, „čistota“ a „nákaza“. Můžeme diagnostikovat nebo identifikovat určitou skupinu lidí na základě jejich mikrobiomu? Lze použít mikrobiomu k forenzním účelům? Hrozí ev. zneužití znalosti o lidském mikrobiomu?

HMP je dnes na samém počátku, ve stadiu, kdy se nabízí mnohem více otázek než odpovědí. Zajímavé budou zejména odpovědi na otázku, zda a jak se složení lidského mikrobiomu podílí na lidském zdraví a nemoci.

### Výkladový slovníček:

**16S rDNA** – gen pro ribozomální RNA, která se vyskytuje u bakterií. Sekvence 16S rDNA umožňuje vědcům nahlédnout do příbuzenských vztahů mezi prokaryotickými biologickými druhy.

**amplifikace** – znnožení úseku DNA.

**Archaea** – doména jednobuněčných (evolučně prastarých) prokaryotických organismů o velikosti od 0,1 do 15 mikrometrů. Od bakterií se lišim strukturou genomu, stavbou buněčné stěny a metabolickými pochody.

**Bacteria** – doména jednobuněčných prokaryotických organismů o velikosti zpravidla několika mikrometrů. Jsou nejrozšířenější skupinou na Zemi.

**Eukaryota** – doména jednobuněčných a mnohobuněčných organismů, jejichž buňky mají pravé jádro a další organely. Mezi eukaryota řadíme rostliny, živočichy včetně člověka a houby.

- genom** – veškerá genetická informace uložená v buňce nebo organismu. Je zapísána v molekule DNA nebo RNA.
- glabella** – trojúhelníkovitá plocha na čele ohraničená koncem kořene nosu a vnitřními póly obou obočí. Místo, kde se vyskytují typické vrásky „nad kořenem nosu“.
- izoprenoidy** – organické látky, nejčastěji rostlinného původu. Mezi izoprenoidy patří sílice, pryskyřice a balzámy. Dělí se na terpenoidy a steroidy.
- leptin** – hormon tukových buněk; je to bílkovinná látka, která hraje klíčovou roli v regulaci příjmu a výdeje energie, včetně chuti k jídlu a úrovně metabolismu.
- mikroevoluce** – typ biologické evoluce, při které probíhají malé změny v rámci jednoho druhu v krátkém časovém horizontu.
- náhodné sekvencování** – metoda zjišťování pořadí nukleotidů v řetězci DNA, tedy její primární struktury. Nejprve dochází k náhodné fragmentaci molekuly DNA z daného vzorku. Každý fragment DNA se sekvencuje a následně se tyto sekvence seřadí pomocí počítačového softwaru.
- prokaryota** – jednobuněčné organismy, které mají jednodušší buňku, než organismy eukaryotické. Prokaryotické organismy netvoří tkáně a orgány, ale mohou tvořit kolonie, ev. vlákna. Bakterie a archaea řadíme mezi prokaryota.
- RNA** – ribonukleová kyselina přítomná ve všech živých buňkách. V organismu se setkáváme hlavně se třemi druhy RNA: mediátorovou RNA (mRNA) přenášející genetickou informaci z DNA do výsledného proteinu; ribosomální RNA (rRNA) zajišťující základní funkce ribosomu a transferovou RNA (tRNA) zajišťující transport aminokyselin k ribosomu.
- sekvenace (sekvencování)** – proces, při němž se určuje pořadí chemických jednotek daného polymeru. Nejčastěji hovoříme o sekvencování DNA, tj. určování pořadí nukleotidových bází v úseku (tj. sekvenci) řetězce DNA.
- sekvenační metody** – biochemické metody, které umožňují sekvenaci polymeru.
- vitamin** – je organická sloučenina charakteru biokatalyzátoru. V lidském těle se účastní mnoha biochemických pochodů. Většinu vitaminů si lidské tělo neumí vytvořit, proto je nutné získávat vitaminy z potravy.