



Biobanking gut microbiome samples – From stool to data

Corinna Bang, CAU Kiel

c.bang@ikmb.uni-kiel.de



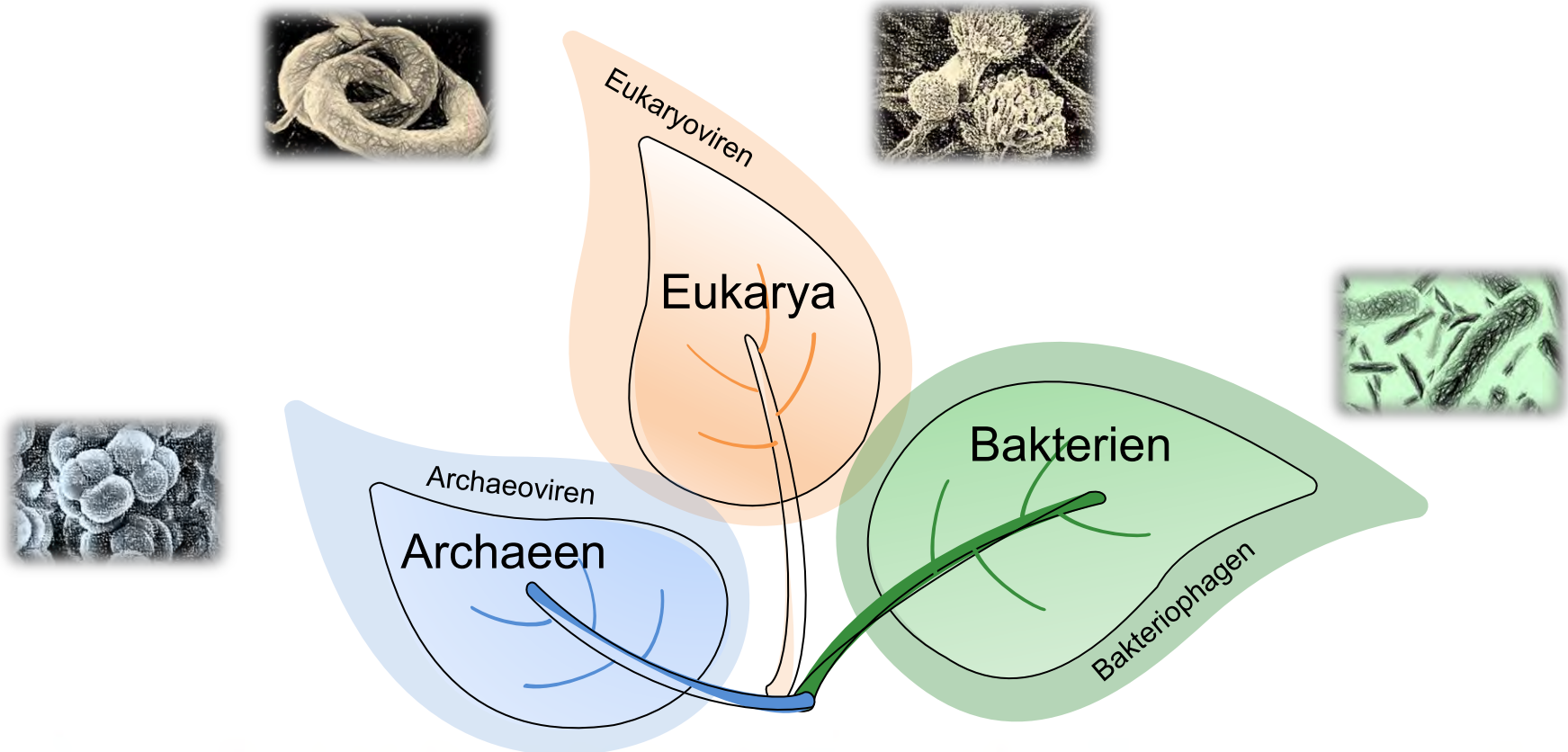
ikmb

Institut für Klinische Molekularbiologie



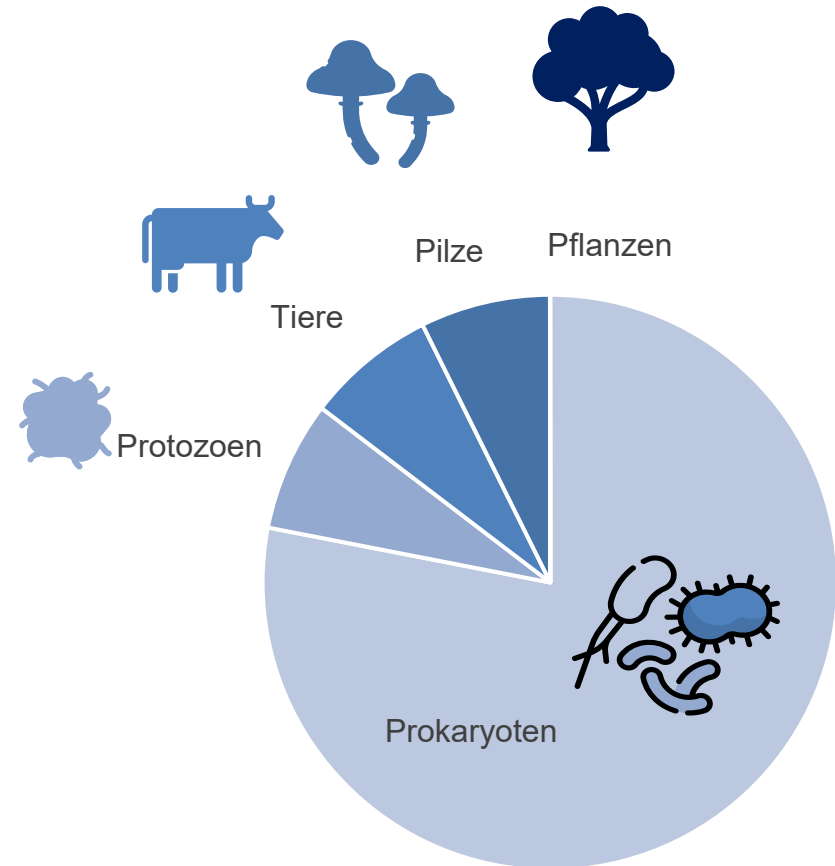
Was ist ein "Mikrobiom"?

= Gesamtheit aller Arten von Mikroorganismen in einem Lebensraum



Diversität von Mikroorganismen

- ▶ Mikroorganismen sind die evolutionär ältesten und diversifiziertesten Lebensformen
- ▶ Kurze Generationenfolge führt zu hoher Anpassungsfähigkeit und enorm vielfältigen Stoffwechselleistungen
- ▶ Mikroorganismen besiedeln jeden Lebensraum und machen ihn so erst für andere Lebewesen bewohnbar

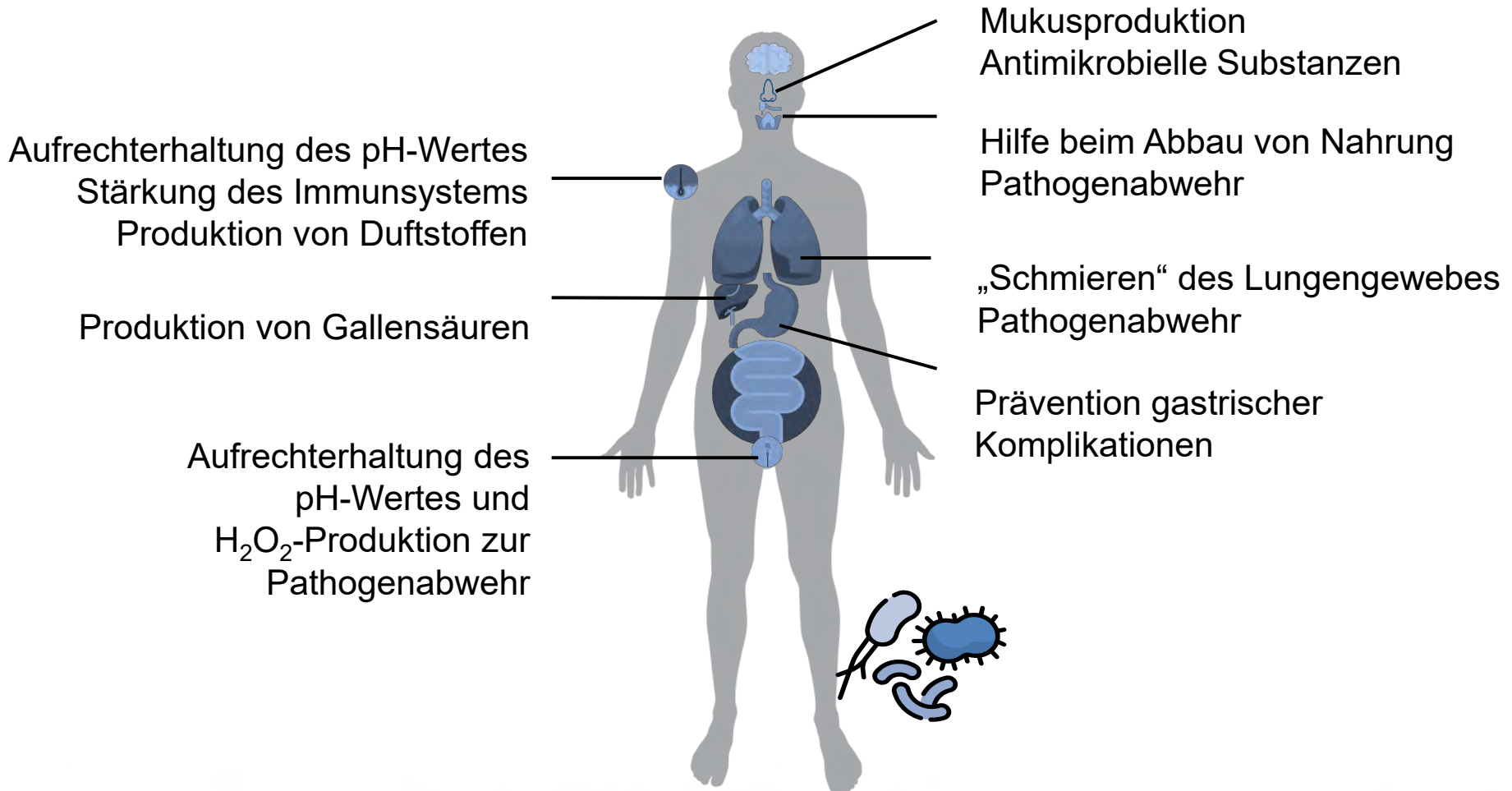


Bedeutung der Mikrobiome für ihre Wirte

- ▶ essentielle Rolle bei der Verdauung, der Nährstoffversorgung und dem Abbau von Xenobiotika
- ▶ beteiligt an der Reifung des Immunsystems sowie dessen ordnungsgemäßer Funktion
- ▶ beteiligt an der Gehirnentwicklung und dem Verhalten („Darm-Hirn-Achse“)
- ▶ Schutz und Beseitigung vor Krankheitserregern



Bedeutung der Mikrobiome für ihre Wirte – nicht nur im Darm

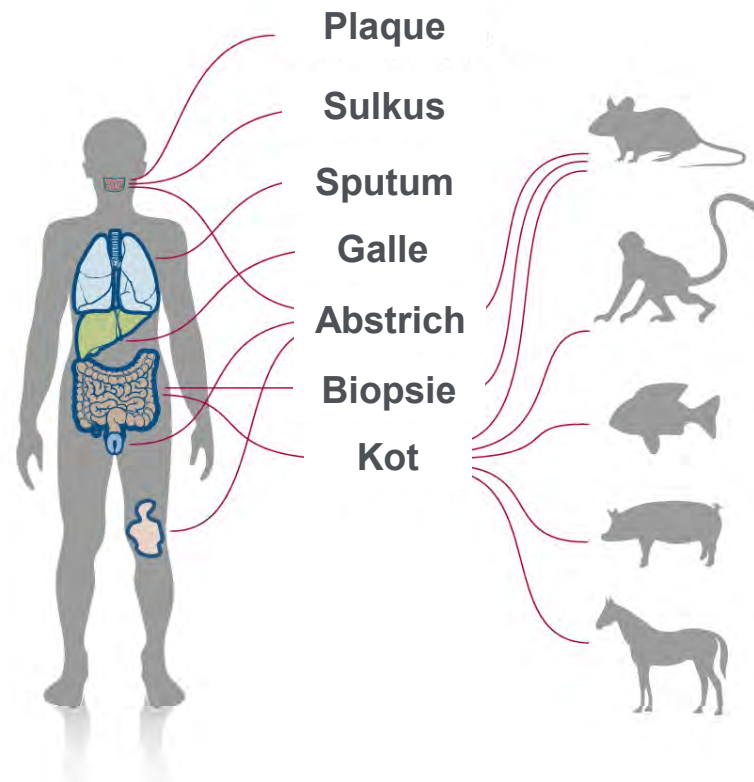


Warum wird das Mikrobiom so intensiv untersucht?

- ▶ Mikrobielle Dysbiosen sind oft krankheitsassoziiert (bspw. Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen)
 - ▶ besonderer Fokus auf dem Darmmikrobiom
 - ▶ aber auch z.B. Darm-Hirn-Achse bei neurologischen Erkrankungen
- ▶ das Mikrobiom gilt v.a. in der Humanmedizin als Ansatzpunkt für innovative Therapien
 - ▶ fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT)
- ▶ Umweltmikrobiome als Ressource für die Biotechnologie

Wie wird das Mikrobiom untersucht?

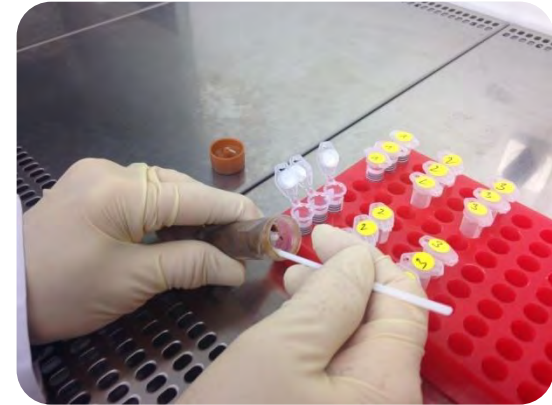
MikrobiomLabor @ZMB/IKMB



Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität Probenvorbereitung

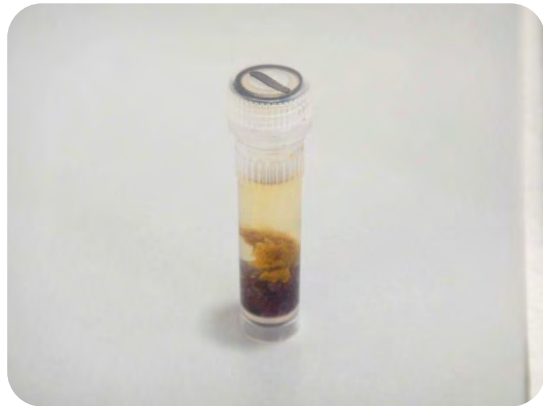


- ▶ Homogenisierung der Probe nach dem Posteingang und der Bestätigung in der Proben-datenbank

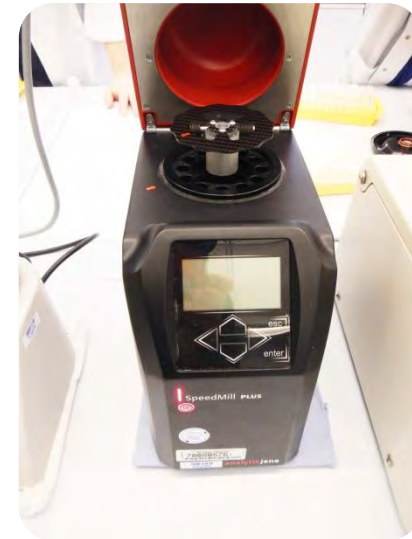


- ▶ Aliquotierung der Proben (rund 200 mg Stuhl sind notwendig für die anschließende Analyse)

Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität Zellaufschluss



- ▶ Überführung der Probe in Gefäß mit Beads (kleine Glaskügelchen) und Lysepuffer

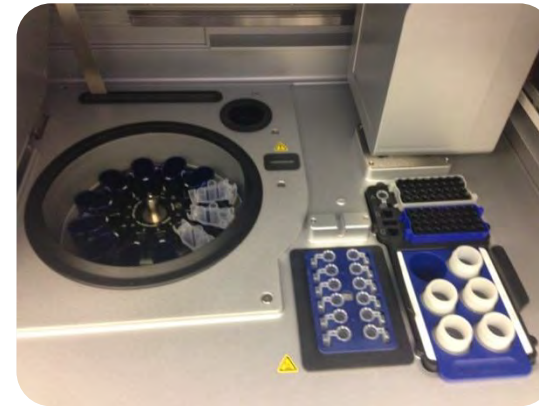


- ▶ „Bead-Beating“ führt zur mechanischen Lyse und Lysepuffer zur chemischen Lyse mikrobieller Zellwände

Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität DNA-Extraktion

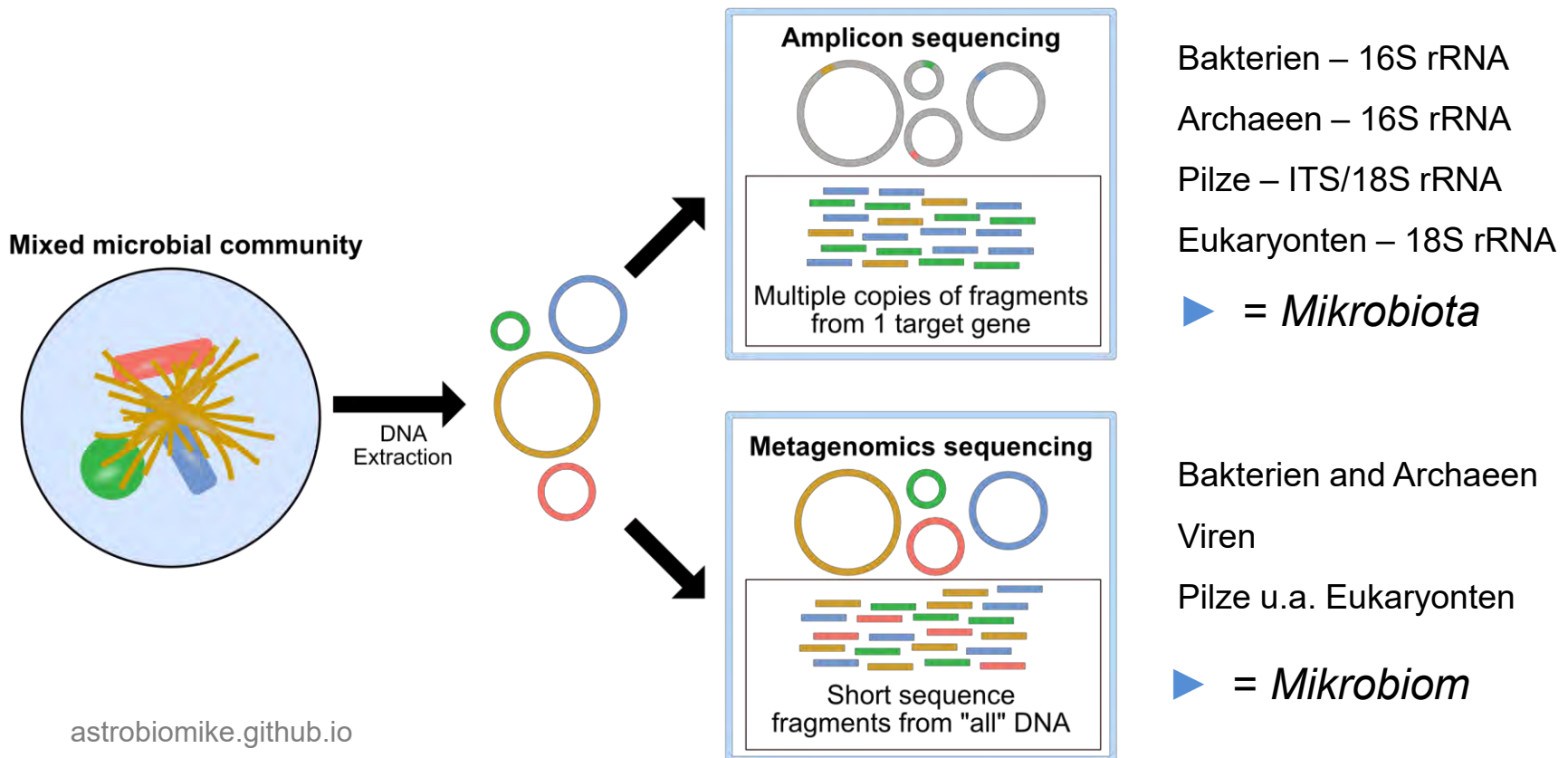


- ▶ Halb-automatisierte Extraktion der mikrobiellen DNA aus dem Überstand der Proben

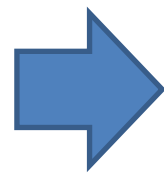
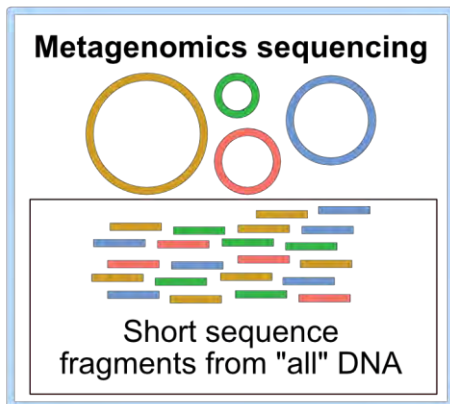
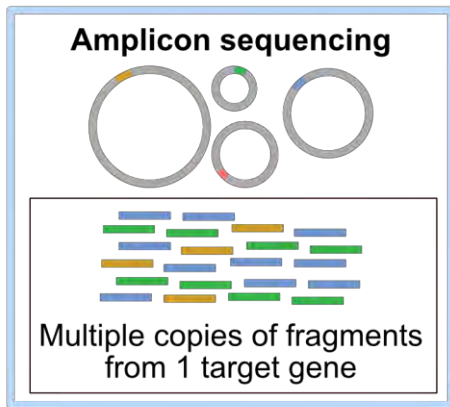


- ▶ DNA bindet spezifisch an eine Kieselgelmembran, während Verunreinigungen passieren
- ▶ PCR-Inhibitoren und Proteine werden in zwei effizienten Waschschrinen vollständig entfernt

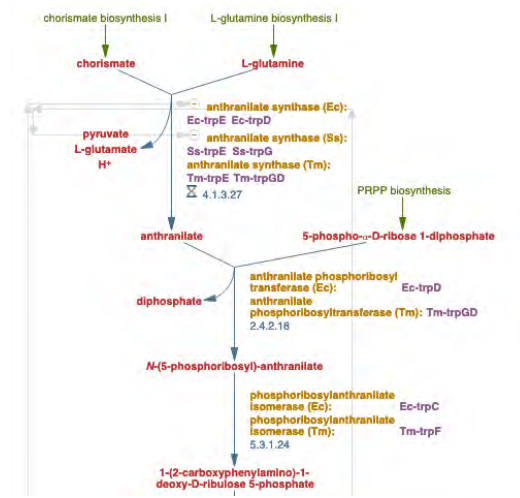
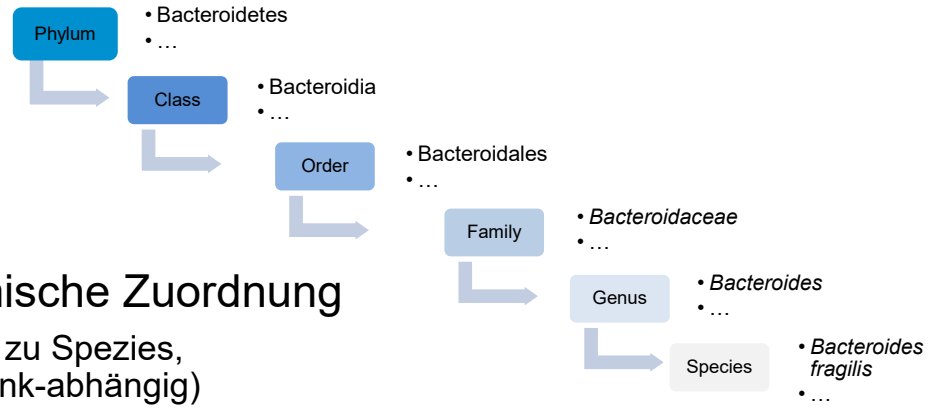
Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität Sequenzierungsstrategien



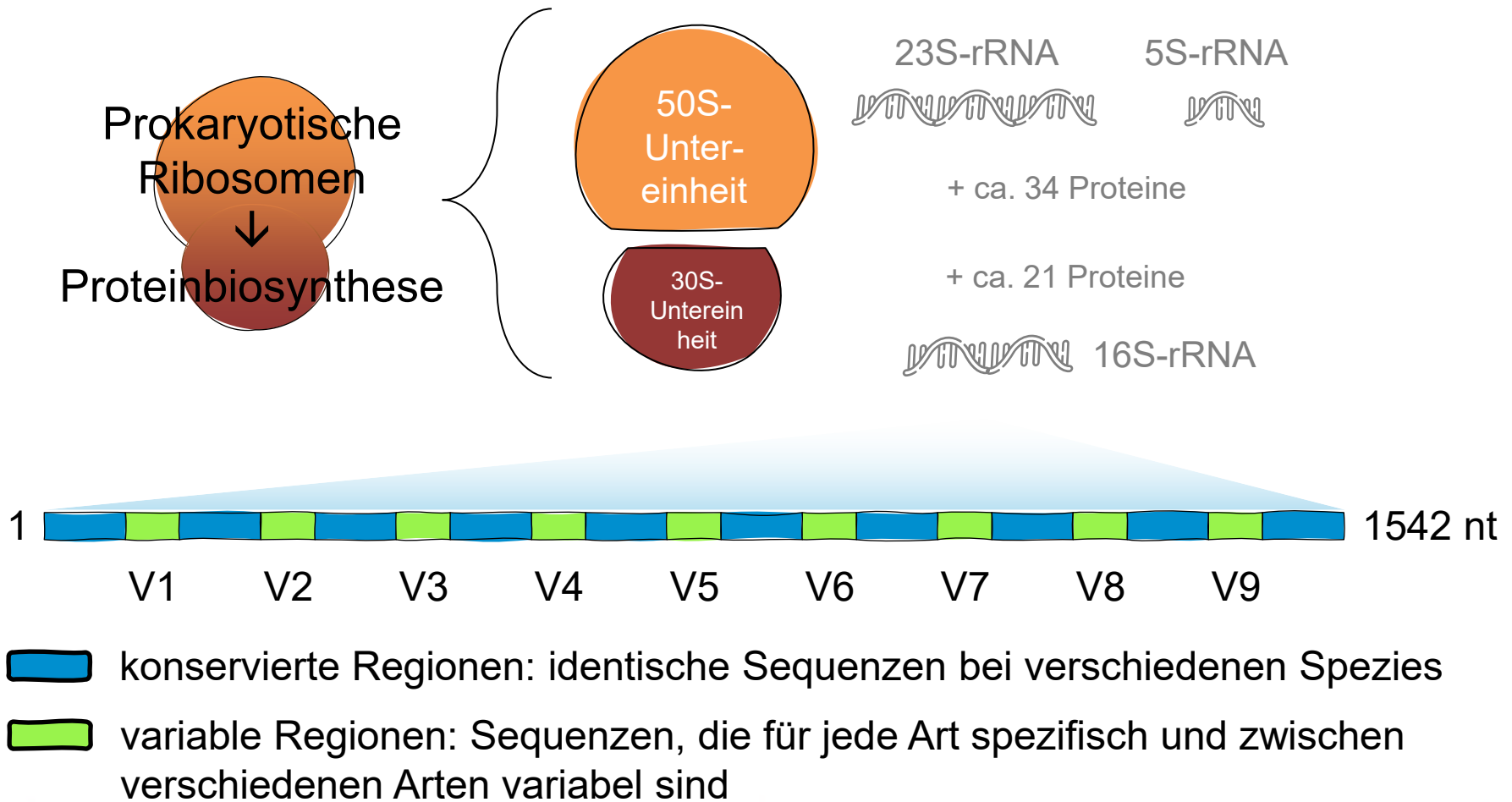
Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität Sequenzierungsstrategien



- Taxonomische Zuordnung (Phylum zu Spezies, Datenbank-abhängig)
- Taxonomische Zuordnung (Phylum zu Stamm, auch unbekannte Mikroorganismen)
- Funktionelle Kapazität
 - Genabundanz
 - Abundanz metabolischer Prozesse

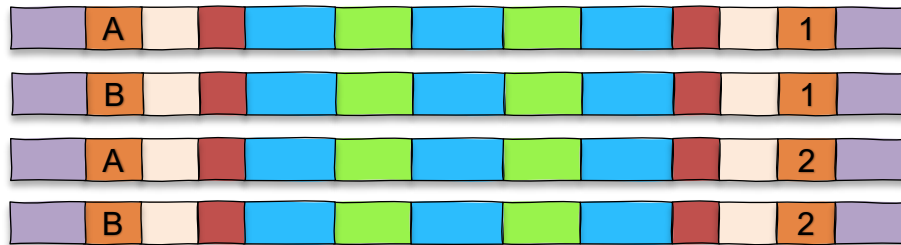
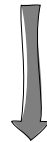
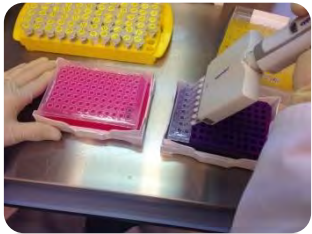
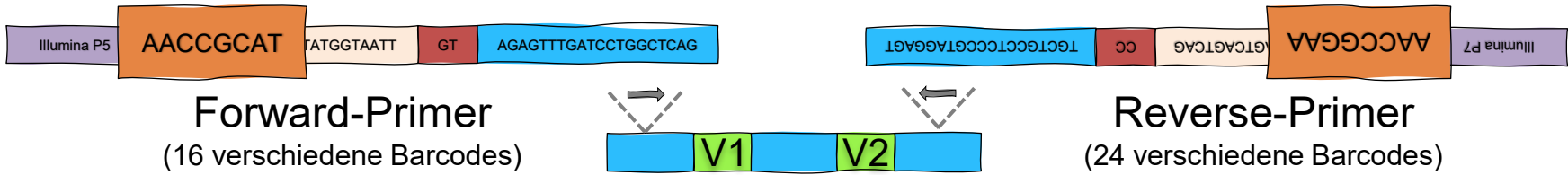


Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität 16S rRNA Gen



Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität

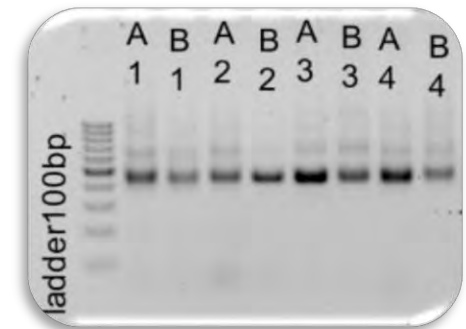
16S rRNA Genanalyse: PCR



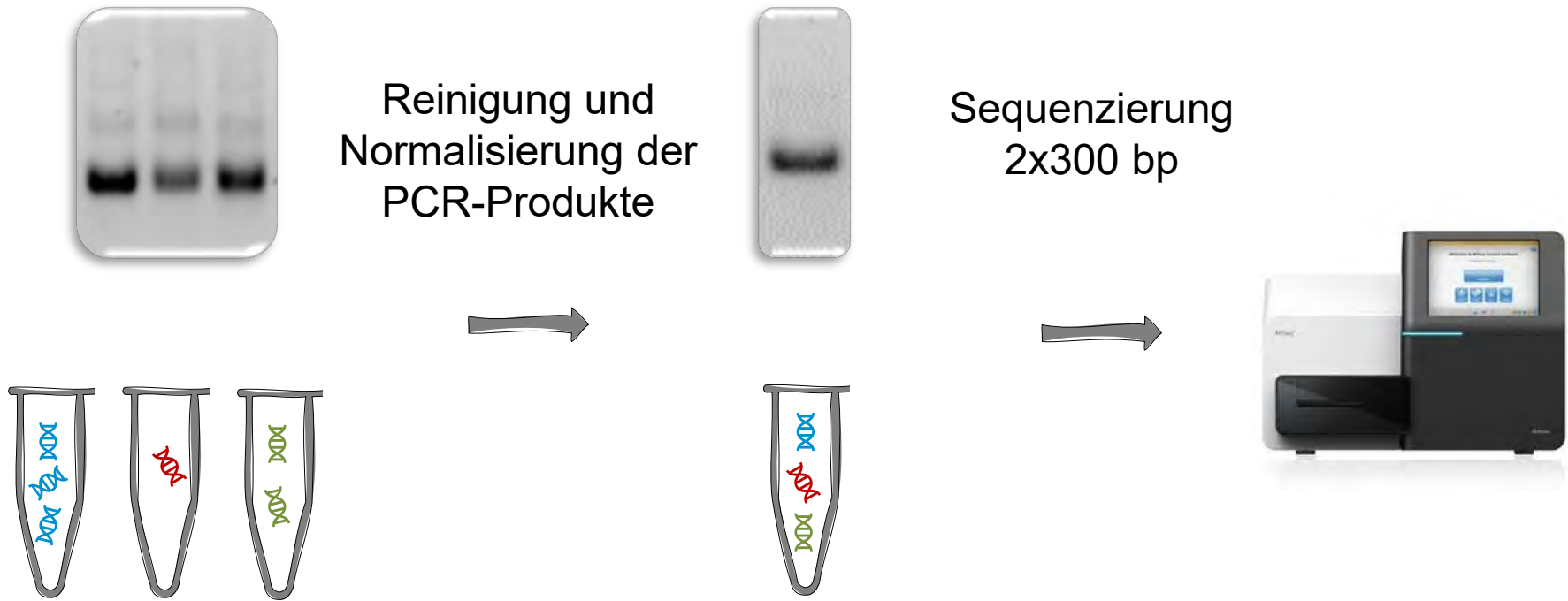
⋮

PCR-Produkte

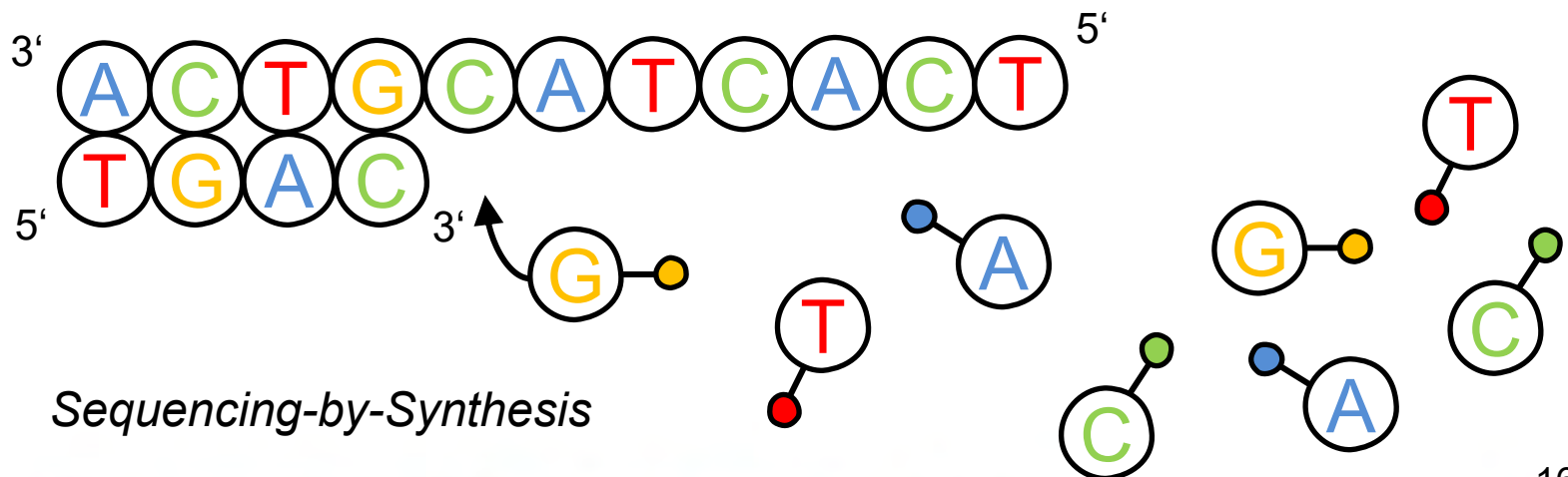
(384 verschiedene Barcode-Kombinationen möglich)



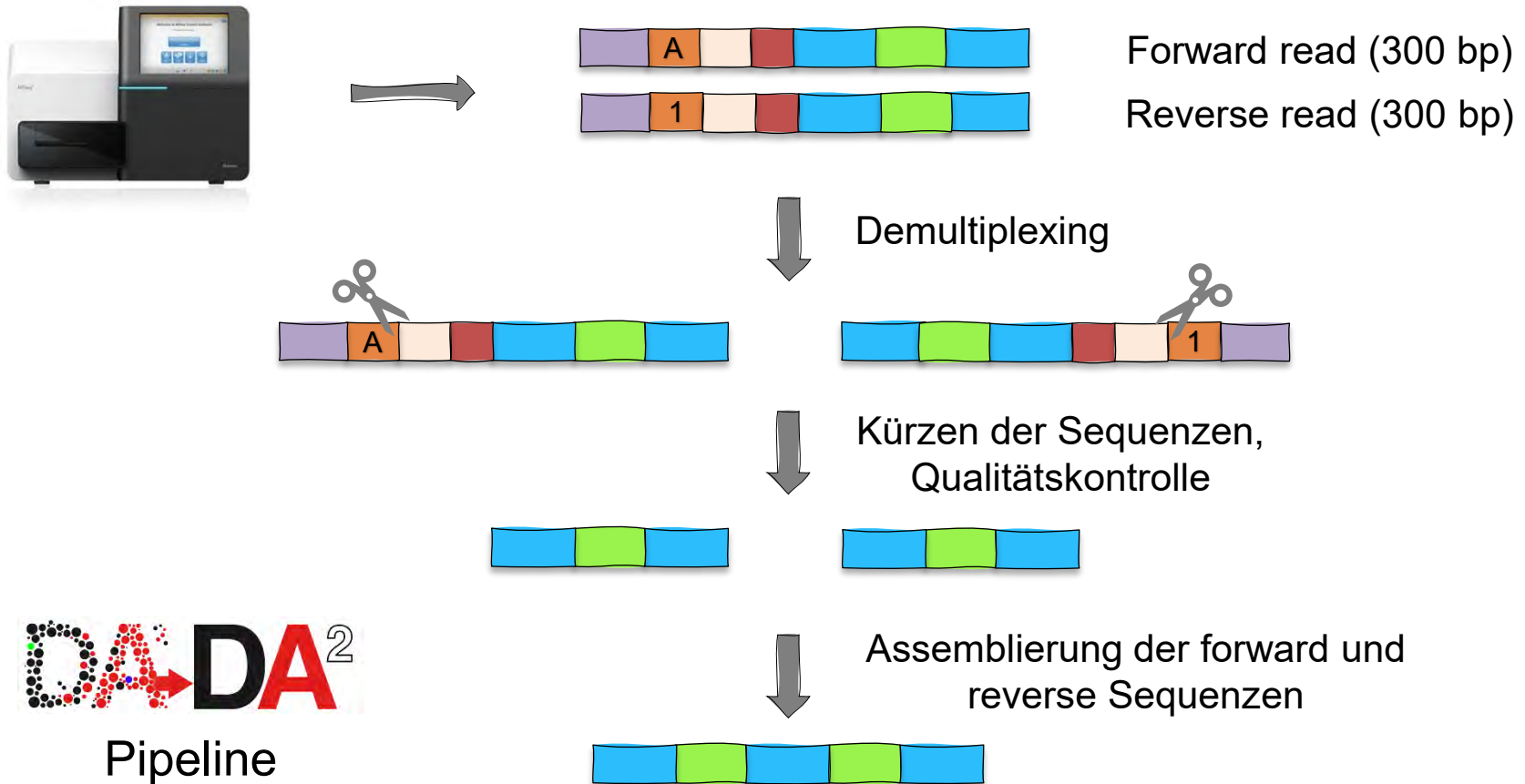
Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität 16S rRNA Genanalyse: Normalisierung



Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität 16S rRNA Genanalyse: Sequenzierung



Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität 16S rRNA Genanalyse: nach der Sequenzierung



Von der Probe zur Bestimmung ihrer mikrobiellen Diversität 16S rRNA Genanalyse: Bioinformatik

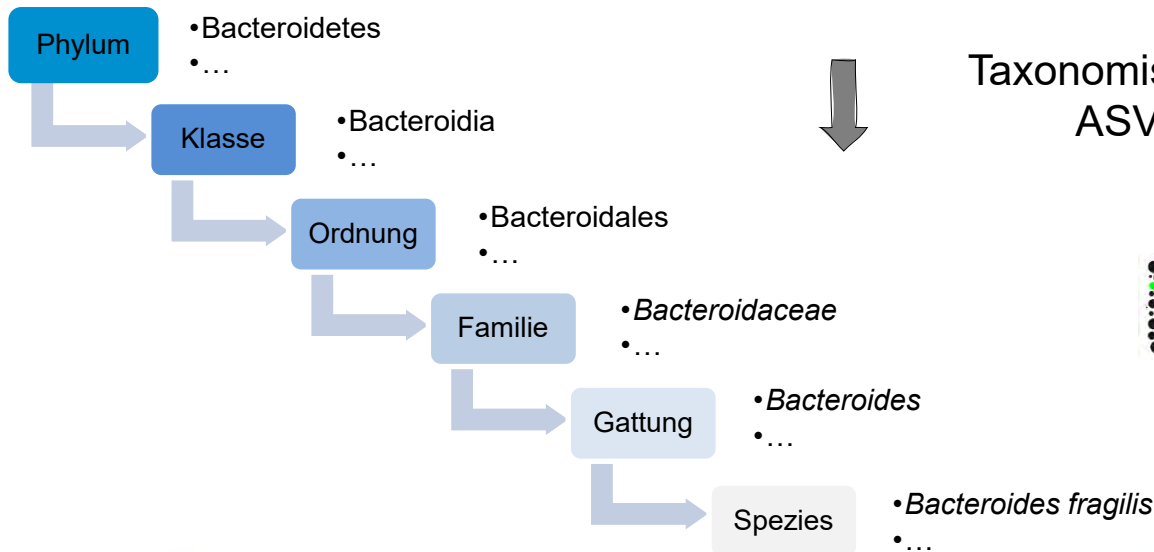
„clean FASTA-files“



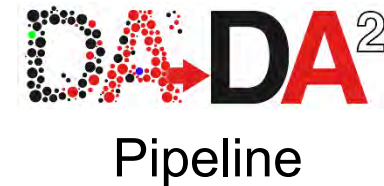
Sequenzname

Sequenz

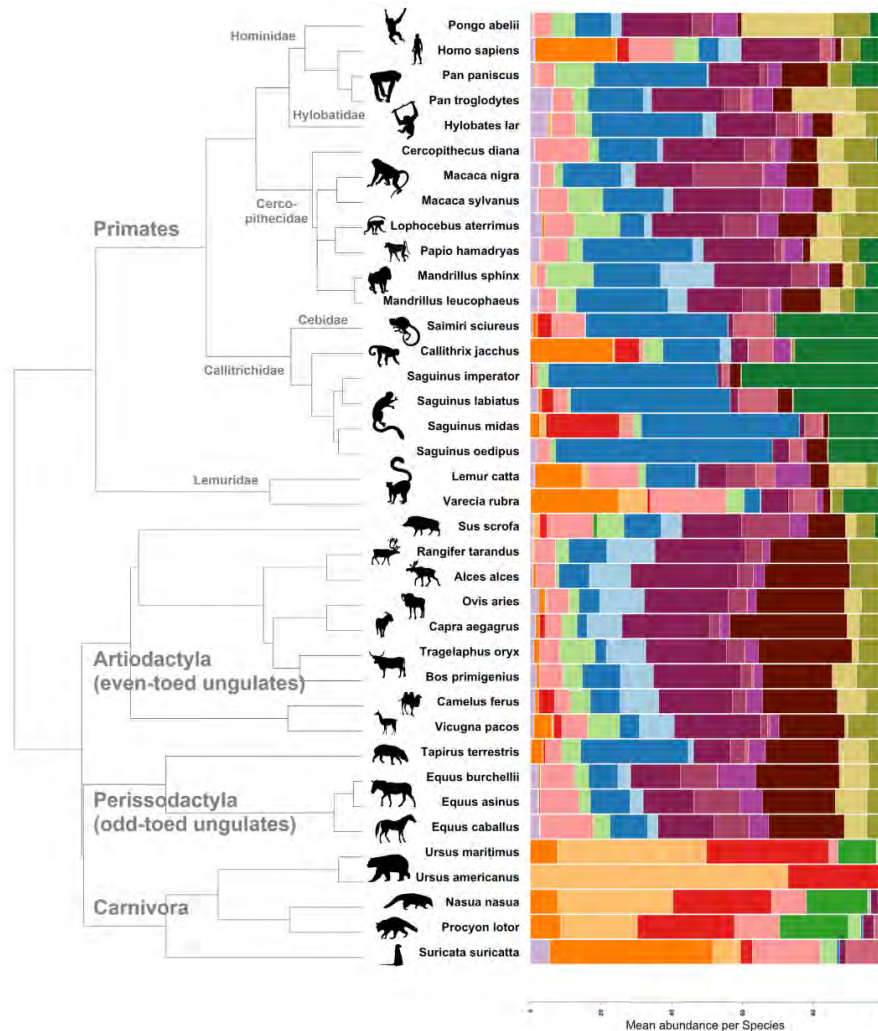
```
>HWI-M01755:38::1:1101:16156:2110 1:N:0:AACGAACGGCTTGGATGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGC/
GGTAGTAGGC GGGGTAACGGCCACCTAGCCAACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAC TGAGACACGGTCCAA>HWI-M01755:
GAAAGATTAATACCTGATAGTATGGTGAGATTGCATGATAGCACCATTAAAGATTTATTGGTAAACGATGGGGATGCGTTCCATTAGGTAGTAGGC GGGGTA/
TGCTATGAGCTGTTTTAGCGGC GGACGGGTGAGTAACGC GTGAGCAACC TTTCCCAGACAGGGGAATAACACACC GAAAGGTGTACTAATACC GCATAAGACC
:2346 1:N:0:AACGAACGGCTTGGATGATGAACGCTGGCGGC GTGCC TAACACATGCAAGTC GAACGGACTTACATTGAAGCCTAGCGATTGTAAATTTAC
```



Taxonomische Einteilung
ASV-Tabellen



Visualisierung von Mikrobiomdaten

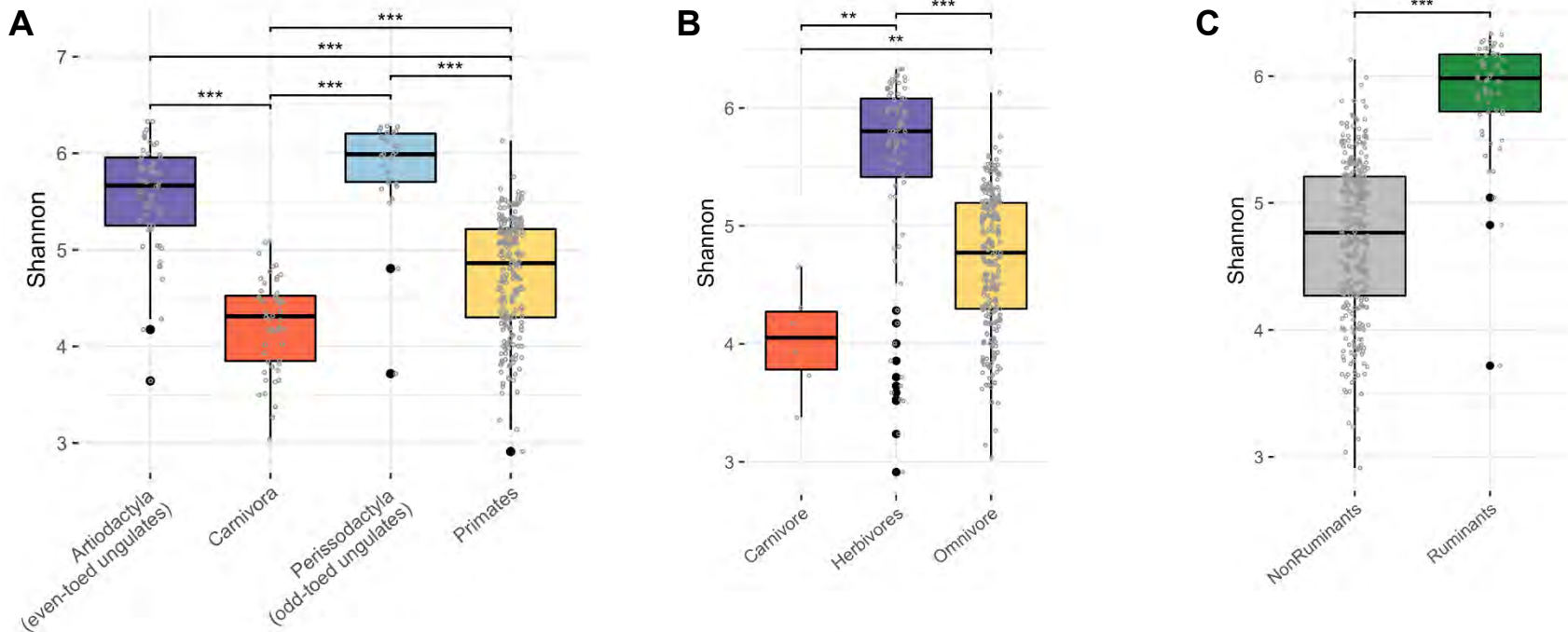


Louise Thingholm

Thingholm LB*, Bang C*, et al. Ecology impacts the decrease of *Spirochaetes* and *Prevotella* in the fecal gut microbiota of urban humans. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):276.

Vergleichende Analyse von Mikrobiomdaten

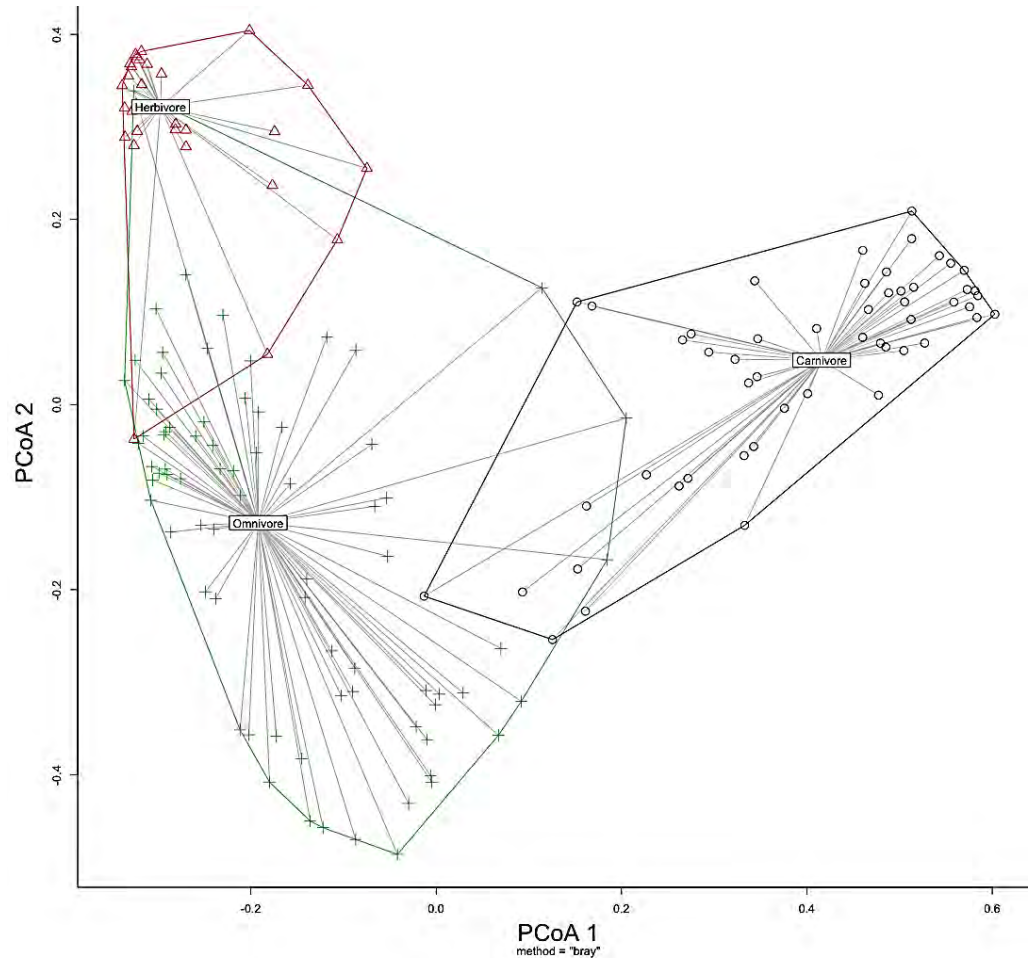
- ▶ **Alpha-Diversität** = Maß für die Artenvielfalt eines Lebensraums, d.h. sie beschreibt die Anzahl der in einem Habitat oder Biotop vorkommenden Arten unabhängig von ihrer Abundanz



Vergleichende Analyse von Mikrobiomdaten

- ▶ **Beta-Diversität** = Maß für den Unterschied in der Artenvielfalt zwischen verschiedenen Lebensgemeinschaften
- ▶ basiert meist auf einer Distanzmatrix

	S1	S2	S3	S4
S1	0	0.8	0.6	0.2
S2	0.8	0	0.4	0.5
S3	0.6	0.4	0	0.7
S4	0.2	0.5	0.7	0



Von der Forschung zur personalisierten Medizin

- ▶ Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der mikrobiellen Diversität sowie ihrer Funktion notwendig, um die Ätiologie humaner Entzündungskrankheiten besser verstehen und behandeln zu können, z.B. innerhalb der NAKO
- ▶ Zusätzlich viele klinische Studien, bspw. die Kieler Familienstudie zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen



Danke!

IKMB Kiel

Andre Franke
Louise Thingholm
Malte Rühlemann
Philipp Rausch

MicrobiomeLab @ IKMB

Ines Wulff
Tonio Hauptmann
Ilona Urbach

NGS Plattform @ IKMB

Sören Franzenburg
All technicians

Administration and IT @ IKMB

Tierparks

Hagenbeck
Berlin Friedrichfelde
Neumünster
Gettorf
Arche Warder
Laintal
Leipzig

