

1. Wstęp. 2. Techniki wykorzystywane do badań mikrobiomu. 3. Poznanie mikrobiomu człowieka w projekcie NIH. 4. Inne korzyści wynikające z realizacji projektu. 5. Jelitowy mikrobiom człowieka. 6. Skład i funkcja mikrobiomu na podstawie badań metagenomowych. 7. Mikrobiota a zachowanie homeostazy. 8. Mikrobiom a indukcja odpowiedzi poszczepiennej. 9. Podsumowanie

Human microbiome – health and disease

Abstract: Commensal microorganisms are known to colonize and form complex communities (microbiome) at various sites within the mammalian body. Because the human microbiome has the potential to affect so many aspects of human health, it has recently become the focus of a series of international human microbiome projects. Such studies are expected to lead to understanding of the impact of microbiota on human health and disease. Recent advances in sequencing technology have opened an entirely new arena in the research of diverse human microbiomes (the ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms). In 2007 the National Institutes of Health launched the Human Microbiome Project to study the human microbiom broadly by examining at least four body sites i.e. gastrointestinal tract, the mouth, the vagina, and the skin. The primary goal of this project is to characterize the human microbiome and determine changes in the microbiome correlated to specific disease states. High-throughput sequencing is used to produce microbiome sequence data of samples from normal and diseased donors. Progress to date includes more than 1000 commensal bacteria genomes that have been completed and deposited in GenBank. In recent years, special attention has been paid to the ability of microbiota to modulate the expression of host genes. This phenomenon forms part of the „cross-talk process” that takes place between the host and its indigenous microbiota. Studies on human intestinal microbiota suggest that host epithelial cells can express specific glycoconjugates in response to the presence of bacteria. Therefore, the gut microflora is responsible for modifying potential sites for attachment. This could be a selective advantage when competing with other bacteria for a niche with limited resources. The mucosal immune system has developed specialized regulatory, anti-inflammatory mechanisms for eliminating pathogens and tolerating commensal microorganisms. Toll-like receptors mediate recognition of microbial patterns to eliminate pathogens. In contrast, commensal bacteria exploit the TLR pathway to actively suppress immunity in order to establish host-microbial symbiosis. Activating anti-inflammatory response in the host via pattern recognition receptor signaling maintains homeostasis. Moreover, it has been shown that the intestinal microbiota composition exerts an effect on the development of immune response to certain vaccine antigens. Thus microbiota along with host human cells form a complex ecosystem which, as a whole interactively performs various biological processes. Their genomes are tightly linked forming an integral part of common metagenome.

1. Introduction. 2. Techniques for the study of human microbiome. 3. The NIH human microbiome project. 4. Additional advantages of launching the human microbiome Project. 5. Human intestinal microbiota. 6. Quality and function of microbiota based on metagenomics sequence data. 7. Microbiota and maintenance of homeostasis. 8. Does the microbiome affect the efficacy of vaccines? 9. Conclusions

Słowa kluczowe: mikrobiom, mikrobiota, metagenom, homeostaza

Key words: microbiom, microbiota, metagenom, homeostasis

1. Wstęp

Organizmy człowieka i zwierząt zamieszkuje co najmniej 10 razy tyle bakterii ile komórek liczą ich organizmy. Stanowią one tzw. endogenną mikroflorę (mikrobiota) stosunkowo mało poznaną i w większości bytująca w układzie pokarmowym [43]. Z chwilą poznania sekwencji ludzkiego genomu okazało się, że wynikające z tego nadzwyczajnego osiągnięcia wnioski, co do znaczenia poszczególnych genów nie są pełne, ponieważ nie są poznane sekwencje oddziałujących na gospodarza (potencjalnie modulujących ekspresję określonych jego genów) miliardów autochtonicznych drobnoustrojów. Takie spojrzenie na mikrobiota wynika z odkrycia, że

mikroorganizmy dysponują możliwościami porozumiewania się nie tylko pomiędzy sobą, ale również mogą prowadzić molekularny dialog z komórkami gospodarza. Wielokierunkowa sieć powiązań (cross-talk process), poprzez którą możliwe jest przesyłanie sygnału i porozumiewanie się bakterii z bakteriami, bakterii z gospodarzem i gospodarza z bakteriami, sprawia, że mikroorganizmy wraz z komórkami gospodarza tworzą kompleksowy interaktywny ekosystem decydujący o wielu różnych procesach biologicznych, w tym o zdrowiu lub o chorobie [7, 8, 19, 39, 44]. Na rolę mikroorganizmów jelitowych w zachowaniu zdrowia zwrócił już uwagę przed ponad stu laty Ludwik Pasteur. Dziś wiemy, że wieloskładnikowe błonowe

* Autor korespondencyjny: Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedry Nauk Przedklinicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, w Warszawie; ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: marian_binek@sggw.pl

„bioczuJNIKI” mikroorganizmów zamieszkujących różne obszary ciała człowieka i zwierząt zdolne są do odbierania zarówno sygnałów fizjochemicznych, jak np. pH, obecności składników pokarmowych, ciśnienia osmotycznego, jak również rozpuszczalnych i strukturalnych składników gospodarza, jak np. składowych powierzchni jego komórki, stanu środowiska, obecności składników odpornościowych, produktów uszkodzenia tkanek itp. Sygnały środowiskowe zbierane są na powierzchni komórki bakteryjnej i transportowane następnie do cytoplazmy, gdzie przetwarzane są przez drugi system czuciowy, znany jako *quorum sensing signaling system*. Bakterie wykorzystują ten sposób komunikacji nie tylko do kontrolowania swojej populacji, ale również do odpowiedzi na czynniki gospodarza uwolnione np. w następstwie uszkodzenia jego tkanek, elementy układu odpornościowego, końcowe produkty niedotlenienia tkanek, itp. Czynniki uczestniczące np. w systemie obronnym gospodarza mogą aktywować lub wyciszać bakteryjny *quorum sensing system* podobnie, jak cząsteczki uczestniczące w *quorum sensing system* mogą aktywować sygnały wysyłane przez gospodarza, lub je wyciszać. Możliwy jest zatem międzydomenowy molekularny dialog pomiędzy bakteriami a różnymi komórkami i tkankami gospodarza. Sygnały wysyłane do komórek gospodarza wpływają na ekspresję określonych jego genów i wytwarzania struktur i czynników korzystnych dla stabilizacji bakteryjnej wspólnoty. Wynika więc z tego, że odpowiedź ze strony gospodarza nie zależy tylko od potencjalnych cech kodowanych w bakteryjnym genomie, ale również od procesów na poziomie molekularnym towarzyszącym relacjom bakterie-gospodarz, ich dynamiki i przestrzeni, w której mają miejsce, jak również czasu ich trwania [44–46]. Niezwykła współzależność (mutualizm) pomiędzy organizmami wyższymi i ich mikrobiontami nasunęła pomysł aby podjąć kolejny projekt, porównywalny do poznania sekwencji genomu człowieka, tym razem koncentrujący się nad poznaniem genomów oraz genów drobnoustrojów głównych nisz ekologicznych człowieka (mikrobiom), jak jamy ustnej, jelit, pochwy i skóry. Przyjęto założenie, że człowiek i mikrobiota tworzą razem superorganizm a ich wspólny genom można określić metagenomem. Termin mikrobiom został zaproponowany w 2001 r. przez Joshua L e d e r b e r g'a dla określenia całości ekologicznego środowiska złożonego z drobnoustrojów komensalnych, symbiotycznych i chorobotwórczych [38].

2. Techniki wykorzystywane do badań mikrobiomu

Dotychczasowe dane na temat ludzkiego mikrobiomu pochodziły głównie z badań opartych o izolację i fenotypową identyfikację drobnoustrojów. Wprowadzenie metod genotypowych, w tym analizy sekwencji

wysoce konserwatywnego regionu 16S rRNA ujawniło, że od 20 do 60% drobnoustrojów składających się na mikroboom człowieka nie hoduje się *in vitro*. Co więcej skład jakościowy mikrobiomu okazał się bardziej złożony niż początkowo sądzono i zróżnicowany osobniczo. Podlega rozwojowi i zmianom w zależności od wieku, środowiska życia, sposobu odżywiania się i rodzaju pokarmu, czynników genetycznych, socjalno-bytowych, kulturowych, itp. [16]. W dotychczasowych badaniach nad mikrobiomem różnych nisz ekologicznych nowo rozpoznawane sekwencje 16S rRNA były porównywane ze znanymi sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych i na tej podstawie wykrywano i identyfikowano do poziomu gatunku trudno lub nie hodujące się mikroorganizmy [49]. Nie zawsze jednak rozpoznanie bakterii było równoznaczne z poznaniem ich właściwości i wypełnianej w określonym ekosystemie funkcji. W związku z tym konieczne było poznanie ich genów, aby na tej podstawie móc przewidzieć potencjalne ich funkcje. W rozwiązaniu tego dylematu posłużono się metagenomiką (genomika populacyjna drobnoustrojów środowiskowych), która bada cały zbiorczy genom mikrobiota na podstawie DNA pozyskanego bezpośrednio ze środowiska. Dzięki nowoczesnym zautomatyzowanym technologiom możliwe jest obecnie sekwencjonowanie ogromnych bibliotek genowych i komputerowe analizowanie uzyskanych danych, dających możliwości poznania genów obecnych u drobnoustrojów tworzących wspólnoty mikrobiologiczne. Ponieważ 80% bakteryjnych genomów to regiony kodujące białka, stąd większość uzyskanych metagenomowych sekwencji zawiera przynajmniej fragment genu odpowiedzialnego za określone funkcje drobnoustrojów. Na tej podstawie możemy zatem przewidzieć wypełniane przez mikrobionty funkcje. Tak więc współczesne badania ilościowe i jakościowe nad mikrobiontami opierają się nie tylko na rozpoznawaniu sekwencji genu 16S rRNA, ale również na identyfikacji genów kodujących swoiste dla danego czynnika cechy oraz kompleksowym poznaniu mikrobiomu tego środowiska. Najczęstszymi technikami badań są: elektroforeza w żelach z gradientem czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis), *Real time* PCR, techniki mikromacierzowe, klonowanie i sekwencjonowanie, w tym pirosekwencjonowanie i inne [16, 28, 29, 33, 41].

3. Poznanie mikrobiomu człowieka w projekcie NIH

Metody badania ludzkiego mikrobiomu oparte o analizę sekwencji 16S rRNA oraz sekwencjonowanie metagenomu znalazły zastosowanie w zainicjowanym w 2007 r. przez National Institutes of Health (USA) 5-letnim projekcie pt. „Human Microbiome”, z założenia mającym być swego rodzaju mapą drogową w naukach

biomedycznych [38]. Koszty projektu skalkulowano na ponad 150 milionów USD, a jego celem jest :

1. Kompleksowe poznanie ludzkiego mikrobiomu w wyniku zastosowania nowych wysokowydajnych technologii sekwencjonowania próbek DNA pobranych z różnych nisz ekologicznych od tzw. „normalnych ochotników”,
2. Ustalenie, czy mikrobiom badanych osobników w liczbie co najmniej 250 różni się w zależności od stanu ich zdrowia,
3. Wypracowanie nowych standardów i technologii, a także ustanowienie etycznych i prawnych norm, tak aby w kolejno podejmowanych przez środowiska naukowe badaniach można je było zastosować bez powtarzania tych etapów badań.

Założeniem podjętych zatem prac jest poznanie i ocena różnic w ludzkim mikrobiomie w zależności od badanej populacji ludzi, ich genotypu, stanu zdrowia, wieku, odżywiania się, stosowanego leczenia, środowiska życia i czynników socjalnych. Przyjmuje się również, że w wyniku realizacji projektu możliwe będzie rozpoznanie 900 nowych sekwencji genomowych bakterii i ich dodanie do sekwencji zdeponowanych już w międzynarodowych bazach danych. Poznanie czynników wpływających na skład jakościowy i ilościowy mikrobiontów oraz ich interakcji z gospodarzem może być wykorzystane w dalszej kolejności do wpływania na zachowanie stanu zdrowia gospodarza poprzez monitorowanie i sterowanie jego mikrobiomem [15, 47, 50]. W pierwszym etapie badań, w próbkach pobieranych z różnych miejsc ciała od tzw. „normalnych”, czyli klinicznie zdrowych ochotników identyfikuje się sekwencje 16S rRNA poprzez porównanie z sekwencjami już zdeponowanymi w bazach danych. Pozwoli to na rozpoznanie gatunków drobnoustrojów i ustalenie ich liczby w danym mikrośrodku. Stworzenie zatem referencyjnego zestawu kompletnych sekwencji genomów jest zasadniczym etapem projektu, ponieważ dopiero na tej podstawie można w dalszej kolejności dokonywać interpretacji poznawanych sekwencji metagenomu. Tak więc te same próbki posłużą również do badań nad metagenomem, identyfikacji genów i poznania potencjalnych ich funkcji [17, 32]. Uzyskane od poszczególnych osobników dane będą analizowane pod kątem ustalenia ewentualnego tzw. rdzennego dla badanych nisz mikrobiomu.

Wstępna faza podjętego projektu określona jako „Jumpstart” została zainicjowana przez 4 wspierane przez NIH centra naukowe, jak The Taylor College of Medicine, The Broad Institute, The J.Craig Center Institute i Washington University School of Medicine dysponujące na dużą skalę technicznymi możliwościami sekwencjonowania. Dotychczasowym wynikiem podjętych w 2009 r. prac jest:

- a) poznanie ponad 500 sekwencji nowych bakteryjnych genomów wykrytych w różnych okolicach

ciała człowieka, dokonanych na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA,

- b) opracowanie protokołu pozyskiwania i selekcji ochotników do badań, pobierania próbek z pięciu podstawowych miejsc ciała człowieka, tj.: układu pokarmowego, jamy ustnej, pochwy, skóry i nosa w pilotażowym doświadczeniu na 250 tzw. normalnych ochotnikach (bez widocznych klinicznie zaburzeń w obszarach pobierania próbek), w równej liczbie kobiet i mężczyzn wywodzących się z różnych populacji.
- c) opracowanie standardów i zasad zachowania jakości w uczestniczących w badaniach laboratoriach oraz sposobów eliminowania błędów i pomyłek wynikających z zanieczyszczeń, artefaktów, itp. [38].

W kolejnym etapie projektu zakłada się kontynuowanie podjętych we wstępnej fazie badań, w tym zsekwencjonowanie co najmniej kolejnych 400 bakteryjnych genomów oraz dodatkowo wirusów i mikroorganizmów eukaryotycznych, stworzenie referencyjnych baz danych uwzględniających sekwencje nowych bakteryjnych genomów oraz opracowanie nowych technologii badań. Istotną częścią projektu jest również poznanie funkcji genów drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobiomu. Zasadnicze wątki podjętych badań dotyczą oceny różnorodności mikrobiomu, poznanie jego stałych elementów oraz zmian w określonych miejscach i sytuacjach mogących wskazywać na związek z chorobą. Ze względu na ograniczony czas projektu, na obecnym etapie planuje się raczej ustalenie zależności pomiędzy zmianami w mikrobiomie w nawiązaniu do stanu zdrowiem lub choroby niż ustalenia przyczyn powodujących chorobę. Jeżeli wspomniane związki uda się wykazać, wówczas w kolejnym etapie badań będzie można skoncentrować się nad czynnikami prowadzącymi do choroby w powiązaniu ze zmianami w mikrobiomie [31, 47, 50].

W jednorocznych równolegle prowadzonych pilotażowych projektach podjęto badania nad zmianami w mikroflorze bakteryjnej, składzie wirusów i grzybów w nawiązaniu do określonych stanów chorobowych. Pobierane są więc próbki od osób z zaburzeniami chorobowymi ze strony skóry, nosogardzieli, jamy ustnej, jelit, układu moczowo-płciowego czy krwi oraz kontrolnie od osób zdrowych. Sekwencjonowaniu podlegają całe genomy bakterii, grzybów i wirusów a w przypadku bakterii i grzybów również identyfikowane są geny rRNA. W wielu z tych badań równocześnie wykrywa się ekspresję genów mikroorganizmów i gospodarza. Uzyskane dane podlegają analizie przez nowe technologie komputerowe przyczyniające się do poznania zjawisk wpływających na stan zdrowia w zależności od składu i stanu mikrobiomu i ekspresji jego genów.

Zasadniczy projekt badań nad ludzkim mikrobiomem wspomagany jest dodatkowo przez 15 innych, realizowanych w formie grantów, dotyczących oceny

tego zjawiska w różnych procesach chorobowych. Dla przykładu, dotyczą one mikrobiomu skóry chorych na łuszczycę (ponad 7,5 mln. chorych w USA), mających wyjaśnić, czy zmiany w normalnej mikroflorze przyczyniają się do powstania choroby [15]. Oprócz tego, w projekcie oceniany jest wpływ używanych w leczeniu środków immunosupresyjnych na mikrobiom skóry. W innym projekcie oceniany jest wirom u dzieci i jego związek z występującymi u nich chorobami gorączkowymi (20 mln. wizyt u lekarza rocznie, w większości przyczyna gorączki nie zdiagnozowana) [38]. Podjęte badania mają również na celu wyjaśnienie zależności pomiędzy wiromem a odpowiedzią immunologiczną. Kolejny projekt dotyczy wyjaśnienia roli mikrobiomu jelitowego w otyłości [25]. Przyjmuje się, że mikrobiom odgrywa zasadniczą rolę w zachowaniu homeostazy energetycznej u człowieka. Wcześniejsze badania ujawniły różnice w mikrobiomie osób otyłych i szczupłych. Obecne badania przeprowadzane są na populacji Amisów, ze względu na ich dużą genetyczną homogenność oraz dotychczasowe określone już czynniki charakteryzujące tę populację. W badaniach nad mikrobiomem pochwy pokłada się nadzieje na wyjaśnienie przyczyn bakteryjnego zapalenia pochwy (identyfikacja wzoru mikrobiomu predysponującego do BV). Również zakłada się, że rozwój *adenocarcinoma* przełyku stymulowany jest przez określony mikrobiom. Rak ten związany ze zgałą spowodowaną refluksem żołądkowo-przełykowym jest coraz częstszą chorobą występująca u ludzi w USA. Nasilenie się tego zjawiska nie da się wyjaśnić czynnikami środowiskowymi, czy zależnymi od gospodarza. Wstępne badania wykazały, że osoby o szczególnym typie mikrobiomu częściej są predysponowane do wystąpienia wczesnego stadium *adenocarcinoma* przełyku. W trakcie rozwoju raka pojawiają się również znaczące zmiany w mikrobiomie. Wykrycie tych zależności ma nie tylko istotne znaczenie diagnostyczne, ale umożliwi podjęcie wcześniejszej terapii i stwarza nadzieję na zapobieganie rozwojowi choroby w wyniku oddziaływania na mikrobiom i doprowadzania do jego zmiany z niekorzystnego na utrzymujący dobry stan zdrowia [38].

Informacje na temat realizacji projektu, uzyskiwanych wynikach i wpływających z nich wnioskach do wiadomości publicznej przekazuje Centrum Analiz i Koordynacji (*Data Analysis and Coordination Center* – DACC). Powołane biuro koordynuje również rozwój badań standaryzacyjnych oraz ułatwia analizę i depozytowanie danych przeznaczonych do użytku publicznego (<http://hmpdacc.org/>). Strona internetowa DACC zawiera katalog szczepów referencyjnych oraz dane na temat każdego z nich, jak np. okolica ciała, z którego izolat pochodzi, jego znanych sekwencji, jak również informacji, który z ośrodków szczep sekwencjonował lub sekwencjonuje [38].

4. Inne korzyści wynikające z realizacji projektu

Realizowany projekt dodatkowo przyczynia się do rozwoju nowych technologii, w tym również takich, które umożliwiają hodowanie *in vitro* bakterii, dotychczas nieznanymi, izolacji pojedynczych komórek i ich DNA, amplifikacji i klonowania, selektywnego wzmacniania wzrostu określonych gatunków bakterii itp. Założeniem niektórych pojedynczych projektów jest również pobieranie próbek z takich miejsc w jelitach, z których zwykle nie są one popierane. Dotyczy to np. bakterii ściśle przylegających do śluzówki, izolacji pojedynczych gatunków techniką *flow-sorting* oraz namnożenia *in vitro* technikami dotychczas nie stosowanymi w hodowli bakterii jelitowych człowieka, w warunkach imitujących panujące w naturze. Pozwoli to na pozyskanie dużych fragmentów DNA również tych gatunków, których sekwencje nie były znane lub znane są tylko fragmentarycznie [16, 28, 32, 41, 47, 51].

Liczne dane otrzymane z przeprowadzonych badań wymagają odpowiedniego ich dokumentowania, analizowania, w tym również metodami statystycznymi, przeprowadzania określonych symulacji i obliczeń statystycznych. To wszystko pływa na rozwój technik komputerowych i opracowanie niezbędnych do tych celów programów.

Zasady upowszechniania uzyskanych w badaniach danych zostały zawarte w porozumieniu z Fort Lauderdale. Ich upublicznienie nastąpi po 12 miesiącach od opracowania [38].

Równolegle z podjętym w 2007 r. z inicjatywy NIH projektem, zorganizowane zostało spotkanie z przedstawicielami ośrodków naukowych świata w celu przedyskutowania utworzenia Międzynarodowego Konsorcjum Badań nad Ludzkim Mikrobiomem (*International Human Microbiome Consortium* – IHMC). Zadaniem tej instytucji jest koordynowanie podobnych badań podejmowanych i realizowanych na świecie, tak aby nie powiełać przeprowadzonych już doświadczeń, wspólnie szybko gromadzić nowe dane, utrzymywać ustanowione standardy badań oraz dzielić się rezultatami wynikającymi z badań. IHMC oficjalnie został powołany we wrześniu 2008 i skupia 10 krajów. Jest otwarty dla członkostwa innych akceptujących przyjęte przez IHMC zasady.

Tak więc projekt poświęcony poznaniu ludzkiego mikrobiomu przesuwają kolejno granicę poznania i wnoszą do nauk medycznych nowe dane na temat zmian w mikrobiomie, odzwierciedlające potencjalny stan zdrowia lub choroby. Przyczynia się do ustanowienia standardów i zasad kontroli jakości. Poznane nowe sekwencje będą traktowane, jako dane referencyjne do wykorzystania w badaniach przeprowadzanych w przyszłości [38].

5. Jelitowe mikrobionty człowieka

Wydaje się, że mikroorganizmy jelitowe stanowią odrębną, w porównaniu do innych środowisk filogenetyczną grupę, która koewoluowała razem ze swoim gospodarzem, nabierając unikatowych cech i wypełniając funkcje, które przyczyniają się do ukształtowania wzajemnych relacji, jako mutualizmu [9, 29, 43]. Próby jakościowej i ilościowej oceny jelitowego mikrobiomu człowieka były podejmowane już wcześniej, głównie w oparciu o ocenę różnic w sekwencjach genu kodującego 16S rRNA. Ich wyniki ujawniły, że nawet 80% fylogentypów (odpowiednik gatunku określony na podstawie analizy 16S rRNA) miało sekwencje gatunków bakterii dotychczas nie hodujących się *in vitro*. Badanie to wykazało również duże indywidualne zróżnicowanie mikroflory. Wchodzące w jej skład bakterie w 98% należały do typów: *Firmicutes* (64%), *Bacteroides* (23%), *Proteobacteria* (8%) i *Actinobacteria* (3%) [17]. W długoterminowych, trwających ponad rok badaniach nad mikroflorą jelitową ludzi otyłych wykazano różnice w ich mikroflorze w porównaniu do osób szczupłych [25]. Podobnie rzecz się miała u osób chorych na nieswoiste zapalenie jelit, którego etiologię w jakiejś części wiąże się z kompozycją mikroflory. Istotnie okazało się, mikroflora jelitowa tych osób była mniej zróżnicowana w porównaniu do mikroflory osób zdrowych [9, 27, 37]. Skład mikroflory jelitowej noworodków podlega gwałtownym zmianom w pierwszym roku życia, wykazuje indywidualne różnice, jednakże jest ona mniej złożona w porównaniu do mikroflory dorosłych [34]. Mikroflora bliźniaków wykazuje istotne podobieństwa na poszczególnych etapach ich rozwoju, natomiast nie stwierdza się wpływu na jej skład w zależności od tego, czy dziecko urodziło się w sposób naturalny czy na drodze cesarskiego cięcia, karmienia piersią, czy pokarmem sztucznym. Źródło bakterii zasiedlających wcześniej jelita noworodka, złożonych głównie ze *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* i *Bifidobacterium*, nie jest do końca ustalone, część z nich przenosi się od matki [7, 23, 34].

Wyniki badań ostatnich lat ujawniły, że to same bakterie decydują o zasiedleniu określonej niszy. Następuje to w wyniku procesu *cross-talk* i wpływania przez drobnoustroje na ekspresję określonych genów gospodarza. W przypadku bakterii jelitowych, można wykazać ich wpływ na powstawanie na komórkach nabłonka jelitowego i komórkach układu immunologicznego glikokoniugatów (*pattern recognition receptors* – PRPs) o wzorze pasującym do molekularnych wzorców mikrobiontów (*microbiota-associated molecular patterns* – MAMPs) [7, 8, 13, 26, 39]. W doświadczeniach na myszach wykazano, że *Bacteroides thetaiotaomicron* poprzez drobne rozpuszczalne związki przesyła biochemiczny sygnał do komórek nabłonka jelitowego, w wyniku którego aktywowana jest α 1,2-

fukozyloftransfera i wytwarzane są fukozylowane glikokoniugaty. Takie receptory z kolei, wpływają na kolonizowanie się tylko określonych bakterii. Opisane zjawisko pokazuje, że bakterie wpływają w sposób selektywny na kolonizowanie przez nie określonych nisz gospodarza. Najczęściej zjawisko to uwarunkowane jest ograniczonymi zasobami substratowymi, czy też wynika z ogólnego bilansu energetycznego danego środowiska. Wydaje się, również, że to bakterie decydują o momencie, w których takie modyfikacje są przez nie indukowane. Dodatkowo modyfikowanie powstałych glikokoniugatów może mieć miejsce w wyniku wytwarzania przez drobnoustroje endo- i egzo- glikozydaz [26, 27].

6. Skład i funkcji mikrobiontów na podstawie badań metagenomu

Poznanie biologicznych cech i funkcji wypełnianej przez poszczególnych członków złożonego środowiska ekologicznego jelit, podlegającego dynamicznym zmianom jest zasadniczym celem badań nad ludzkim mikrobiomem. O funkcji wypełnianej przez jelitowy mikrobiom można wnioskować na podstawie poznania właściwości wyizolowanych *in vitro* drobnoustrojów. Jak wspomniano wcześniej, z przebadanych metodą sekwencjonowania 16S rRNA bakterii jelitowych, tylko około 20% hoduje się *in vitro*. To sprawia, że badanie funkcji w przeważającej liczbie nie hodujących się bakterii należy prowadzić innymi metodami a więc poszukiwać takiego rozwiązania, które bez konieczności izolacji bakterii *in vitro* daje szansę na poznanie ich właściwości. Takie możliwości daje metagenomika, która bada sekwencje DNA pobranego bezpośrednio ze środowiska jelita, traktowanego jako jeden wspólny zespół genów. Ponieważ prawie 80% bakteryjnego genomu to regiony kodujące białka, dlatego większość sekwencji metagenomu stanowią geny związane z określoną funkcją. W ten więc sposób można przewidzieć wypełnianą przez nieznaną i nie hodującą się bakterie jelitowe funkcję [16, 29, 32, 37, 41, 51]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach, w których zsekwencono 78 megazasadowy (Mpz) metagenom mikrobiomu jelitowego człowieka, stwierdzono znaczącą liczbę genów nie występujących w genomie człowieka. Ich produkty biorą udział w metabolizmie nie rozkładanych przez człowieka związków, jak np. wielocukrów, niektórych aminokwasów i ksenobiotyków, biosyntezie witamin i isoprenoidów. Wyniki tych badań wskazują na symbiotyczne oddziaływanie mikroflory, z którą organizm gospodarzem tworzy razem superorganizm, którego zespół genów można określić jako metagenom [17]. Geny mikrobiomu jelitowego można zgrupować w dwóch zbiorach ortologicznych, jeden liczniejszy charakterystyczny dla dorosłych i dzieci oraz drugi

mniejszy, typowy dla niemowląt. W większości są to geny związane z metabolizmem cukrów, z tym, że u dorosłych ich produkty (w tym wytwarzane przez *Bacteroides*) uczestniczą w degradacji wielocukrów, a u niemowląt w transporcie cukrów. Sugeruje to, że funkcja mikrobiota jest zależna od ilości określonych substratów diety i wraz ze wzrostem określonych komponentów stwierdza się większą liczbę genów, których produkty zaangażowane są w metabolizm tych związków (w przypadku wielocukrów ich rozkład do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, w tym masłowego, przyczynia się do wytworzenia produktów stanowiących dla gospodarza główne źródło energetyczne bakteryjnego pochodzenia). Zjawisko to ilustruje również funkcjonalną adaptację mikrobiontów do określonego środowiska gospodarza [11, 51].

Porównanie genów bakterii jelitowych do genów bakterii występujących w innych środowiskach, jak np. w wodzie morskiej, wodzie słodkiej, glebie, roślinach a także w stosunku do genów występujących u mikroorganizmów komensalnych i patogennych ujawniło najwyższy odsetek takich samych genów u bakterii komensalnych. Te, u których odsetek ten jest niższy, nakładają się na geny występujące u patogenów, co sugeruje, że komensalne bakterie o niskim odsetku genów typowych dla mikroflory jelitowej mogą być pierwotnym rezerwuarem patogenów [17, 47]. Porównanie najważniejszych gatunków bakterii stanowiących składniki mikroflory jelitowej i mających najwyższą proporcję genów typowych dla bakterii jelitowych bytujących u osób dorosłych i niemowląt wykazało istotne różnice pomiędzy gatunkami niosącymi wspomniane geny, jak i ich proporcjami. U osób dorosłych geny takie były zlokalizowane w genomie różnych gatunków zaliczanych głównie do rodzajów *Bacteroides*, *Eubacterium* i *Ruminococcus*. Z kolei u niemowląt geny te były zlokalizowane głównie w genomie bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Gatunki bakterii, u których wspomniane geny występowały w wyższej proporcji dominowały w jelicie [17].

W konkluzji można więc powiedzieć, że wysoki odsetek genów bakterii komensalnych kodujących określone funkcje bakterii jelitowych świadczy o takiej ich ewolucyjnej przemianie, w wyniku której zyskały cechy dające im przewagę nad mikroorganizmami konkurencyjnymi, wraz ze zdolnością do kolonizowania jelit określonego gospodarza i przetrwania w tym środowisku. Również pozwala na wypełnianie określonych funkcji w ekosystemie, którego są składową. Taka funkcjonalna adaptacja powoduje, że drobnoustroje jelitowe nie są na ogół zdolne do życia w innych środowiskach różniących się zasobnością niezbędnego pokarmu, czy innymi warunkami [9, 22, 24].

Około 75% genów metagenomu wykazuje identyczność sekwencji sięgające od 40 do 100% do genów

występujących u znanych bakterii. Na tej podstawie w składzie mikroflory możemy wyróżnić dwie grupy drobnoustrojów, takich, których podobieństwo sekwencji genów do sekwencji genów metagenomu przekracza 80% i takich, których ID wynosi od 50 do 80%. Do typowych bakterii z pierwszej grupy należy zaliczyć rodzaj *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bifidobacterium* i *Bacteroides*. Natomiast niskie podobieństwo sekwencji genów metagenomu stwierdzono w porównaniu do sekwencji genów występujących u takich rodzajów, jak *Bacillus*, *Clostridium* i *Streptococcus*. Prawdopodobnie gatunki wymienionych bakterii nie były dotychczas wyizolowane *in vitro* i ich sekwencje nie zostały jeszcze poznane [17].

7. Mikrobionty a zachowanie homeostazy

Badania nad funkcją genów bakterii komensalnych, decydujących o kolonizowaniu się w jelitach ujawniły, że ich zmienna regulacja transkrypcji powoduje, iż bakterie adaptują się do środowiska w zależności od dostępności składników pokarmowych. Takie zdolności stwierdzono między innymi u *Bacteroides thetaiotaomicron*. Z kolei o kolonizowaniu się *Bacteroides fragilis* decyduje ekspresja powierzchniowych glikanów. Geny odpowiedzialne za kolonizowanie się bakterii odkryto także u wielu szczepów pałeczek *Lactobacillus*. Obecność innych bakterii również wpływa na to zjawisko. Zasiedlenie przewodu pokarmowego myszy bezbakteryjnych *Bifidobacterium longum* i *Bacteroides thetaiotaomicron* oddzielnie i razem ujawniło, że *B. longum* wpływa na dostępność substratów cukrowcowych niezbędnych dla *B. thetaiotaomicron*, a więc reguluje jego rozprzestrzenianie się. Co więcej, *B. longum* w towarzystwie *B. thetaiotaomicron* przyczynia się do obecności innych bakterii ponieważ obniżenia ekspresję genów gospodarza odpowiedzialnych za antibakteryjną aktywność skierowaną przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [4, 11, 13, 20, 26, 27, 39].

W reakcji z układem immunologicznym gospodarza bakterie komensalne wykazują szereg cech wspólnych z bakteriami chorobotwórczymi. Ich elementy składowe ściany komórkowej, jak np. lipopolisacharyd (LPS), kwasy lipotejchowe, czy peptydoglikan są rozpoznawane przez białka błonowe stanowiące receptory komórek gospodarza, jak receptory Toll-podobne (Toll-like receptor – TLR). Znajdują się one na powierzchni komórek nabłonka jelitowego, dróg oddechowych, adipocytów, komórek tucznych, dendrytycznych i makrofagów. W sytuacji normalnej odpowiedzi gospodarza ich połączenie się z odpowiadającym im molekularnym wzorcem drobnoustrojów powoduje uruchomienie cyklu przemian, w wyniku, których aktywacji ulega czynnik transkrypcyjny NF- κ B i cytokinowe geny promotorowe. Doprowadza to do masowej produkcji cytokin i che-

mokin, syntezy antybakteryjnych peptydów i aktywacji komórek dendrytycznych skutkujących eliminacją drobnoustroju. Podobnie aktywowane endotoksyną makrofagi (przez TLR4) rozpoczynają w przeciągu kilkunastu minut produkcję cytokin prozapalnych takich, jak TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i innych [6, 12, 42].

Aktywacja TLR i w konsekwencji transaktywacja NF- κ B przyczynia się również do produkcji przez enterocyty defensyn. W doświadczeniach na myszach udowodniono, że bakterie komensalne są zdolne do indukcji poprzez TLR chroniącej gospodarza odpowiedzi przeciwzapalnej ale również te same bakterie w sytuacji, w której nie jest on zdolny do produkcji przeciwzapalnej IL-10, indukują przynoszącej gospodarzowi szkodę odpowiedź zapalną [1, 27, 35]. Przykład ten pokazuje, że relacje pomiędzy gospodarzem i mikroorganizmami są pewną formą wysublimowanej równowagi, wynikającej z kontrolowanego pobudzenia układu immunologicznego, w wyniku czego może dochodzić do rozwoju prozapalnej reakcji, kiedy mikroorganizmy lub ich produkty będą wnikały np. poza granice jelit lub przeciwzapalnej reakcji gospodarza w sytuacji ich bytowania w granicach jelit.

Komórki nabłonka jelitowego, komórki Paneth'a i dendrytyczne są źródłem wielu endogennych substancji przeciwbakteryjnych, jak lizozym, fosfolipaza, różnych przeciwdrobnoustrojowych peptydów, jak α -defensyn, angiogeniny 4, czy RegIII γ [5]. Ten ostatni czynnik jest lektyną typu C ulegającą ekspresji w wyniku sygnału przesyłanego w następstwie aktywacji TLR. Sygnał ten może być jednak hamowany między innymi przez pałeczki *Bifidobacterium*. Inne receptory występujące na komórkach gospodarza, jak białka NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) wykazują zdolność łączenia się z peptydoglikanem i polisacharydem oraz przekazywania sygnału aktywującego NF- κ B niezależnie od receptorów TLR. W wyniku aktywacji przez petydoglikan NOD2 obecnych na komórkach Paneth'a dochodzi do ekspresji α -defensyn. Mutacja genu kodującego NOD2 koreluje z wystąpieniem niektórych objawów choroby Leśniowskiego-Crohna. Ekspresja α -defensyn w jelitach cienkich u osób chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna obejmująca jelita cienkie ulega znaczącemu zahamowaniu, nie dotyczy to jednakże pacjentów z chorobą obejmującą okrężnicę [40, 48]. Innym przykładem stabilizującego oddziaływania mikrobiontów na środowisko jelit jest aktywność niektórych szczepów ziarniaków *Enterococcus*, które regulują fosforylację receptorów aktywowanych proliferatami peroksyzomów gamma (*peroxisome proliferators-activated receptor* γ – PPAR- γ). Przyczyniają się na tej drodze do indukcji ekspresji genów docelowych w tym odpowiedzialnych za wytwarzanie przeciwzapalnie oddziałującej IL-10. Myszy pozbawione PPAR- γ nie są w stanie utrzymać homeostazy jelitowej

[3]. Z kolei *Bacteroides thetaiotaomicron* za pośrednictwem PPAR- γ powoduje redystrybucję ReIA, stanowiącego podjednostkę NF- κ B w cytoplazmie w wyniku czego dochodzi do selektywnego osłabienia odpowiedzi zapalnej. *Saccharomyces boulardii* produkuje natomiast mały, ciepłostabilny czynnik zapobiegający degradacji I κ Ba co ogranicza wiązanie się NF- κ B z DNA i ekspresję IL-8. Na podobnej drodze przeciwzapalnie oddziałuje również *Bacteroides thetaiotaomicron*. Ten ostatni gatunek bakterii dodatkowo „wymusza” na gospodarzu produkcję fukozylowanych glikanów w miejsce sialowanych glikanów, ponieważ sam wykorzystuje fukozę, jako źródło energii. Dzieje się tak prawdopodobnie za sprawą wytwarzanego czynnika sygnałowego (*control of signal production* – CSP) aktywującego transkrypcję genów fukozylotransferazy [1,8,26]. Przytoczone dane pokazują, że bakterie autochtoniczne i ich produkty w wyniku oddziaływania na jądrowy czynnik, jakim jest PPAR- γ uczestniczą w regulacji odpowiedzi przeciwzapalnej gospodarza.

Inne mechanizmy bakteryjnego kształtowania homeostazy jelitowej zachodzą poprzez ich produkty metabolizmu, jak np. kwas masłowy będący produktem bakteryjnej fermentacji cukrów, indukuje on ekspresję przeciwbakteryjnego peptydu katelicyny. Powoduje też przyhamowanie nadmiernego wzrostu bakterii. Zabijając bakterie ogranicza ich kontakt z nabłonkiem jelitowym i minimalizuje stymulowanie odpowiedzi zapalnej [17]. Niektóre antybakteryjne peptydy ulegają wysokiej ekspresji w okresie postnatalnym [30]. W doświadczeniach na myszach zauważono, że u zwierząt urodzonych naturalnie LPS aktywuje receptor TLR, w wyniku czego dochodzi do przekazywania sygnału uruchamiającego kaskadę wewnątrzkomórkowych przemian. Zjawisko to nie występuje natomiast u myszy urodzonych na drodze cesarskiego cięcia. Może to sugerować, że w trakcie naturalnego porodu dochodzi do ekspozycji noworodków na komensalną florę matki i ich zasiedlenia się w jelitach. Rozpoczyna się w ten sposób pewien proces kształtowania się wzajemnych relacji pomiędzy mikro- i makroorganizmem prowadzący do zachowania tolerancji i stabilnej równowagi [21,24,35,39]. Produkowane również przez jelitową tkankę limfatyczną (*gut-associated lymphoid tissues* – GALT) przeciwciała wydzielnicze IgA w znacznym stopniu wpływają na liczbę i skład mikroflory jelitowej [36]. Jelitowa alkaliczna fosfataza uczestniczy z kolei w defosforylacji reszt fosforanowych LPS-u, przez co związek ten traci właściwości toksyczne, a to z kolei zapobiega penetracji bakterii przez komórki nabłonka jelitowego [14]. Wynika więc z tego, że również wspomniany enzym przyczynia się do zachowania jelitowej homeostazy.

Badania nad kaskadą przemian uruchomionych sygnałem z aktywowanego przez LPS TLR4 makrofagów wykazały ekspresję dwóch grup genów. Jedne z nich

odpowiadały na stymulację LPS-em we wczesnej fazie i były to geny kodujące prozapalne cytokiny i druga odpowiadająca na powtórny stymulację LPS-em skupiająca geny odpowiedzialne za wytwarzanie antybakteryjnych peptydów. Odpowiednia modyfikacja białek histonowych wpływała regulacyjnie na te przemiany i decydowała o wrażliwości na bakteryjne zakażenie. zachorowanie [4, 27].

W wyniku koewolucyjnego rozwoju gospodarza i jego autochtonicznej mikroflory dochodzi do wytworzenia mechanizmów tolerancji i braku odpowiedzi gospodarza na mikroorganizmy komensalne oraz skierowanie reakcji obronnej przeciwko patogenom. Biorą w niej udział przeciwciała IgA alkaliczna fosfataza, wiele różnych antybakteryjnych peptydów oraz mechanizmy kontrolujące odpowiedź prozapalną. W odpowiedzi na to patogenne mikroorganizmy wykształciły mechanizmy adaptacyjne, jak również wytwarzają szereg czynników zjadliwości, w tym białek efektorowych zapewniających im dodatkowe sposoby inwazji, czy też unikania reakcji ze strony układu odpornościowego gospodarza. Poprzez wpływ na odpowiedni skład mikrobiontów przyczyniają do rozwoju odpowiedzi pozapalnej. Mikroorganizmy komensalne z kolei ewoluują nie tylko w kierunku wypełniania określonych w środowisku jelit funkcji, jak np. rozkładania cukrów, wytwarzania energii, przyspieszania dojrzewania i proliferacji komórek nabłonka jelitowego, ale również w kierunku eliminacji niepożądanych zdarzeń prowadzących do indukcji odpowiedzi pozapalnej [4, 17, 27, 35].

8. Mikrobiom a indukcja odpowiedzi poszczepiennej

Rola bakterii jelitowych w trawieniu i wchłanianiu się pokarmu, rozwoju jelit i syntezie substancji, których gospodarz sam nie jest w stanie wytworzyć, jak np. witamin została dość dobrze poznana. Również w świetle ostatnich badań pewna skłonność do zachorowań lub oporność na choroby przewodu pokarmowego, jak nieswoiste zapalenie jelit i inne, otyłość, czy również choroby obejmujące inne narządy związane są ze składem jelitowych mikrobiontów [18, 25, 37]. Dość dobrze poznany jest także udział bakterii jelitowych w rozwoju układu immunologicznego związanego z jelitami, indukcji mechanizmów odpornościowych i tolerancji na florę własną. Nie do końca jednak wiadomo, czy jelitowe mikrobionty wpływają na odporność indukowaną szczepionkami. Wiadomo, że występujące w jelitach segmentowane bakterie o morfologii niciowatej przyczyniają się do dojrzewania obecnych w tym środowisku limfocytów T. Mając na względzie oddziaływanie jelitowych bakterii na aktywność niektórych leków podawanych doustnie nie wyklucza się, że mogą one również wpływać na przetwarzanie wchodzących w jej skład anty-

genów [8, 21]. Badania kliniczne nad skutecznością doustnych szczepionek przeciwko polio, zakażeniom rotawirusami i cholercie wykazały ich niższą immunogenność u osób wywodzących się z krajów rozwijających się w porównaniu do populacji krajów wysokorozwiniętych o wysokich standardach higieny. Szczepionka przeciwko cholercie zastosowana u nikaraguańskich i szwedzkich dzieci indukowała dużo niższą odpowiedź immunologiczną u tych pierwszych. W badaniach z użyciem żywej szczepionki okazało się, że bakterie obficie namnażają się w jelitach dzieci pochodzących z krajów ubogich i prawdopodobnie tym faktem należy tłumaczyć niskie miana skierowanych przeciwko nim przeciwciał. Podobne doświadczenia przeprowadzone z użyciem szczepionki na bazie różnych szczepów *Shigella flexneri* u dorosłych i dzieci w Bangladeszu i USA wykazały wysoką odporność poszczepienną u Amerykanów i niską u ludności zamieszkującej Bangladesz [10]. W stawianych hipotezach mających na celu wyjaśnianie opisanych różnic uwzględnia się warunki socjoekonomiczne, dostępność pożywienia, czynniki genetyczne, jak również ewentualną wczesną ekspozycję ludności na te lub pokrewne mikroorganizmy. Chociaż zjawisko to jest słabo poznane, nie wyklucza się również wpływu jelitowych mikrobiontów na indukcję odporności w następstwie doustnego szczepienia. Analogicznie do obserwacji, co do prawdopodobnego wpływu wysokiej higieny we wczesnym okresie życia człowieka na wyższą skłonność takich osobników do alergii, nie wyklucza się, że podobnie rzecz się ma z indukcją poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej. Przypuszcza się, że w stosunku do mikrobiota osobników narażonych na większą ekspozycję mikroorganizmów (antygenów) w społecznościach żyjących w niskich standardach higieny, organizm gospodarza wytwarza szerszą w stosunku do nich tolerancję, obejmującą również antygeny szczepionkowe, z którymi lub podobnymi mógł się spotkać w przeszłości. Powyższa hipoteza została poparta doświadczeniem na kurczętach, u których wcześniejsze podanie antybiotyków (ograniczenie składu mikrobiontów) wpływało na wzrost miana przeciwciał po immunizacji zwierząt drogą pokarmową. Doświadczenie to pokazuje również, że określone populacje bakterii mają wpływ na poszczepienną odpowiedź immunologiczną. Co więcej, niektóre probiotyczne bakterie w krótkim okresie po ich podaniu (od 1 do 5 tygodni) wpływają na zwiększenie odpowiedzi poszczepiennej przeciwko cholercie, salmonellozie, polio i zakażeniom rotawirusowym. Podobnie dodatnią korelację pomiędzy podaniem probiotyków a szczepieniami parenteralnymi zaobserwowano u niemowląt szczepionych przeciwko błonicy, tężcowi, zakażeniom *Haemophilus influenzae* typu B i zapaleniu wątroby typu B [4, 10]. Przytoczone dane nie pochodzą niestety z badań długofalowych, dlatego nie wiadomo, jak te zależności kształtują się wraz

z rozwojem życia człowieka. Nie wyklucza się jednak, że probiotyki wpływając na wzrost jednych populacji bakterii i przyhamowując wzrost innych mogą na tej drodze wpływać również na efektywność doustnych szczepionek. W doświadczeniu na myszach podanie frukto-oligosacharydowego prebiotyku zwiększało odpowiedź poszczepienną przeciwko pałeczkom *Salmonella*. Autorzy tego eksperymentu nie przeprowadzili jednak badań, z których wynikałoby, że miało to związek ze zmianami w mikroflorze jelitowej. Jednakże w innym doświadczeniu, w którym u myszy zastosowano mieszaninę prebiotyków, takich jak galakto- i frukto-oligosacharydów wykazano, że przyczyniło się to do podniesienia odporności ogólnej w wyniku szczepienia przeciwko grypie. W tym przypadku zaobserwowano wzrost niektórych składowych zespołu mikrobiontów sugerujący udział wspólnoty mikroorganizmów w indukcji odpowiedzi immunologicznej gospodarza [10].

Przytoczone dane pokazują, że mikrobionty mają wpływ na kształtowanie odpowiedzi poszczepiennej, jednakże istota tego zjawiska w większości jest niewyjaśniona. Ale już na tym etapie wiedzy poznanie mikrobiomów różnych, często geograficznie odległych ludzkich populacji może przyczynić się do prognozowania skuteczności szczepionek, jak również takie ich antygenowe dostosowanie, aby bardziej specyficzniej i efektywniej indukowały odporność.

9. Podsumowanie

Badania nad mikrobiomem różnych nisz ekologicznych człowieka niewątpliwie przyczynią się do lepszego zrozumienia znaczenia drobnoustrojów autochtonicznych w biologii organizmu wyższego, w tym poznania tych relacji, które składają się na zachowanie zdrowia lub rozwoju choroby [2]. Analiza mikrobiomu w zależności od genotypowych cech gospodarza, jak również jego metabolicznego fenotypu pozwoli na poznanie tych wszystkich czynników, które oddziałują ze strony gospodarza na własne mikrobionty i ich reakcje przyczyniające się do zachowania homeostazy. Tworzenie zintegrowanych metabolicznych map (obejmujących zarówno gospodarza, jak i mikrobionty) takich środowisk i wykrywanie bioczynników wskazujących na predyspozycję do określonej choroby może przyczynić się do rozwoju nowych metod diagnostycznych w odniesieniu do poszczególnych osób, specyficznego doboru leków, czy też zindywidualizowanego leczenia. Wiele aktywnych bakteryjnych czynników i molekularnych mechanizmów ich interakcji z gospodarzem zostało dotychczas poznanych. Znacznie więcej jest jednak w dalszym ciągu nieznanych. Odkrycie nowych genów mikrobiontów i ich funkcji w wyniku realizowanego projektu badań nad mikrobiomem człowieka

oraz ich powiązanie z genami człowieka, które odpowiadają na sygnały wysyłane przez bakterie jest kluczowe dla pełnego poznania fizjologii człowieka i poznania tych składników diety, które wpływają na liczbę i skład jelitowych mikrobiontów. W takim sensie realizowany projekt „Human Microbiome” otwiera drogę do nowego poznania, w którym organizm człowieka i jego mikrobionty są ze sobą ściśle powiązane tworząc jeden wspólny superorganizm, a ich genomy można traktować jako wspólny metagenom [17].

Piśmiennictwo

1. Acheson D.W., Luccioli S.: Microbial-gut interaction in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 238–404 (2004)
2. An G., Shapiro M., Crandall M., Issa M., West M.: Critical illness as ecological collapse: modeling the impact of stress, ischemia, and therapy on host-bacterial ecology of the gut. *Surg. Infect.* **9**, 277 (2008)
3. Are A., Aronsson L., Wang S., Greicius G., Lee Y.K., Gustafsson S., Arulampalam V.: *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPAR γ activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1943–1948 (2008)
4. Blum S., Schiffrin E.J.: Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **4**, 53–60 (2003)
5. Brandl K., Plitas G., Schnabl B., DeMatteo R.P., Pamer E.G.: MyD88-mediated signals induce the bacterial lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* **204**, 1891–1900 (2007)
6. Brisbin J.T., Gong J., Sharif S.: Interaction between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Anim. Health Res. Rev.* **9**, 101–110 (2008)
7. Bry L., Falk P.G., Midvedt T., Gordon I.J.: A model for host-microbial cross-talk in an open mammalian ecosystem. *Science*, **272**, 1380–1383 (1996)
8. Clavel T., Haller D.: Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **8**, 25–43 (2007)
9. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 35–1638 (2005)
10. Ferreira R.B.R., Antunes L.C.M., Finlay B.B.: Should the human microbiome be considered when developing vaccines? *PLoS Pathogens*, **6**, 1–2 (2010)
11. Flint H.J., Bayer E., Rincon M.T., Lamed R., White B.A.: Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 121–131 (2008)
12. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R.: Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modification. *Nature*, **447**, 972–978 (2007)
13. Freitas M., Axelsson L.G., Cayuela C., Midvedt T., Trugnan G.: Microbial-host interactions specifically control glycosylation pattern in intestine mouse mucosa. *Histochem. Cell Biol.* **118**, 149–161 (2002)
14. Goldberg R.F., Austen W.G., Zhang X., Munene G., Mustafa G., Biswas S., McCormack M., Eberlin K.R., Nguyen J.T., Tafliedede H.S., Warren H.S., Narisawa S., Millan J.L., Hodin R.:

- Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3551–3556 (2008)
15. Grieco E.A., Segre J.A.: The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 244–253 (2011)
 16. Handelsman J.: Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669–685 (2004)
 17. Hattori M., Taylor T.D.: The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Research*, **16**, 1–12 (2009)
 18. Holmes E., Loo R.L., Stamlor J., Bictash M., Yap I.J.S., Chan Q., Ebbels T., De Ioro M., Brown I.J., Veselkov K.A., Daviglus M.L., Keteloot H., Ueshima H., Zhao L., Nicholson J.K., Elliott P.: Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*, **453**, 396–400 (2008)
 19. Hörmannspurger G., Haller D.: Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 63–73 (2010)
 20. Hooper L.V., Gordon J.I.: Commensal host bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115–1118 (2001)
 21. Kelly D., King T., Aminov R.: Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res.* **622**, 58–69 (2007)
 22. Kizerwetter-Świda M., Binek M.: Salivaricin B gene-its localization and RFLP analysis in two potentially probiotic *Lactobacillus salivarius* strains. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **54**, 513–516 (2010)
 23. Koenig J.E., Spor A., Scalone N., Fricker A.D., Stombaugh J., Knight R., Angenent L.T., Ley R.E.: Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000081107
 24. Lee Y.K., Mazmanian S.K.: Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, **330**, 1768–1773 (2010)
 25. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)
 26. Liu C.H., Lee S.M., Vanlare J.M., Kasper D.L., Mazmanian S.K.: Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3951–3956 (2008)
 27. Lu L., Walker W.A.: Pathologic and physiological interaction of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 1124S–1130S (2001)
 28. Mardis E.R.: The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* **24**, 133–141 (2008)
 29. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R.: Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for Real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7220–7228 (2004)
 30. Ménard S., Forster V., Lotz M., Gütle D., Duerr C.U., Gallo R.L., Henques-Normark B., Pütsep K., Andersson M., Glocker E.O., Hornet M.W.: Developmental switch of interstitial antimicrobial peptide expression. *J. Exp. Med.* **205**, 183–193 (2008)
 31. Mira A., Martin-Cuadrado A.B., D'Auria G., Rodriguez-Valera F.: The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int. Microbiol.* **13**, 45–57 (2010)
 32. Morita H., Kuwahara T., Ohshima K., Sasamoto H., Hoh K., Hattori M., Hayashi T., Takami H.: An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* **22**, 214–222 (2007)
 33. Pallen M.J., Loman N.J., Penn Ch.W.: High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 625–631 (2010)
 34. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O.: Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**, e177. doi:10.1371/journal.pbio.0050177 (2007)
 35. Pamer E.G.: Immune response to commensal and environmental microbes. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 1173–1178 (2007)
 36. Peterson D.A., McNulty N.P., Guruge J.L., Gordon J.I.: IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe*, **2**, 328–339 (2007)
 37. Peterson D.A., Frank D.N., Pace N.R., Gordon J.I.: Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*, **3**, 417–427 (2008)
 38. Peterson J., Garges S., Giovanni M., McInnes P., Wang L., Schloss J.A., Bonazzi V., McEwen J.E., Wetterstrand K.A., Deal C., Baker C.C., Di Francesco V., Howcroft T.K., Karp R.W., Lunsford R.D., Wellington C.R., Belachew T., Wright M., Giblin C., David H., Mills M., Salomon R., Mullins C., Akolkar B., Begg L., Davis C., Grandison L., Humble M., Khalsa J., Little A.R., Peavy H., Pontzer C., Portnoy M., Sayre M.H., Starke-Reed P., Zakhari S., Read J., Watson B., Guyer M.: The NIH human microbiome project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
 39. Rautava S., Walker W.A.: Commensal bacteria and epithelial cross talk in the developing intestine. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **9**, 385–392 (2007)
 40. Reiff C., Kelly D.: Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 25–33 (2010)
 41. Relman D.A.: New technologies, human-microbe interaction, and the search for previously unrecognized pathogens. *J. Infect. Dis.* **186**, S254–S258 (2002)
 42. Round J.L., Lee S.M., Li J., Tran G., Jabri B., Chatila T.A., Mazmanian S.K.: The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, **332**, 974–977 (2011)
 43. Savage D.C.: Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133 (1977)
 44. Seal J.B., Morowitz M., Zabornia O., An G., J.C. Alverdy.: The molecular Koch's postulates and surgical infection: a view forward. *Surgery*, **147**, 757–765 (2010)
 45. Shapiro J.A.: Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **38**, 807–819 (2007)
 46. Stańkowska D., Kaca W.: Systemy komunikacji międzykomórkowej bakterii Gram-ujemnych i ich znaczenie w ekspresji cech fenotypowych. *Post. Mikrobiol.* **44**, 99–111 (2005)
 47. Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.E.: Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, **428**, 37–43 (2004)
 48. Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schab M., Linzmeier R., Feathers R.W., Chu H., Lima H., Fellermann K., Ganz T., Stange E.F., Bevins C.L.: Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1943–1948 (2005)
 49. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 161–177 (1977)
 50. Zaura E., Keijsers B.J.F., Huse S.H., Crielaard W.: Defining the healthy „core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* **9**, 259–271 (2009)
 51. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M.: High throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, **57**, 1605–1615 (2008)