

Gedurende mijn onderzoeksperiode aan het Microbiome Research Centre (MRC) van de University of New South Wales (UNSW) in Sydney heb ik me verdiept in verschillende methoden voor het analyseren van het darm microbioom. Dit verslag biedt een overzicht van de belangrijkste vaardigheden en technieken die ik heb verworven, evenals de uitkomsten van mijn onderzoeksprojecten tijdens deze periode.

Verworven vaardigheden:

1) 16S rRNA microbioom analyses: Binnen het Erasmus Rotterdam Gezondheid Onderzoek (ERGO/Rotterdam Study) hebben wij momenteel microbiom data beschikbaar die verkregen zijn door middel van 16S rRNA analyses. Dit is een methode die een specifieke regio van het 16S rRNA gen leest, wat voorkomt in bacteriën. Dit betekent dat dit type sequencing alleen deze soort micro-organismen kan identificeren. In dit cohort heb ik eerder analyses uitgevoerd om de associatie tussen het darm microbiom en glaucoom te onderzoeken (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10851784/>). Tijdens mijn verblijf aan MRC UNSW heb ik echter nog meer ervaring opgedaan met het uitvoeren van 16S rRNA analyses, met behulp van speciaal ontworpen pipelines. Deze kennis heb ik toegepast om de associatie tussen het darm microbiom en leeftijdgebonden macula degeneratie (LMD) te bestuderen. De volgende analyse stappen zijn daarbij aan bod gekomen:

- Voorbereiding van data voor analyse: het verwerken van sequentiegegevens, inclusief demultiplexing.
- Kwaliteitscontrole van amplicon sequenties: het beoordelen van de kwaliteit van de verkregen sequenties en het identificeren van eventuele artefacten of fouten.
- Taxonomische annotatie van 16S rRNA sequenties: het toewijzen van taxonomische informatie aan de verkregen sequenties. Dit is essentieel voor het begrijpen van de microbiële samenstelling in het darm microbiom.
- Alfa en bèta diversiteitsanalyse: het kwantificeren en vergelijken van de diversiteit binnen en tussen microbiële gemeenschappen. Bijvoorbeeld: hebben LMD patiënten een andere samenstelling van het darm microbiom dan mensen zonder LMD?
- Differentiële abundantie analyse: met behulp van geavanceerde statistische technieken zoals LEfSe kan worden onderzocht welke bacteriën in grotere of kleinere aantallen voorkomen tussen verschillende groepen monsters. Hiermee kunnen we ontdekken welke bacteriën belangrijk zijn en mogelijk een rol spelen bij het onderscheiden van de ene groep monsters van de andere. Bijvoorbeeld: zijn er micro-organismen die vaker of minder vaak voorkomen in het darm microbiom van iemand met LMD vergeleken met dat van iemand zonder LMD?
- Multivariabele associatie analyse: het uitvoeren van multivariabele analyses met Maaslin2. Hierbij kan er rekening gehouden met meerdere factoren tegelijkertijd. Dit is belangrijk omdat microbiële gemeenschappen door veel verschillende factoren beïnvloed kunnen worden en het nodig is om deze factoren gezamenlijk te analyseren om nauwkeurige conclusies te trekken. Maaslin2 maakt gebruik van lineaire modellen om de relaties tussen microbiële data en metadata te onderzoeken. Dit helpt bij het kwantificeren van hoe sterk elke factor bijdraagt aan veranderingen in de microbiële gemeenschap. Maaslin2 corrigeert voor potentiële verstoringende factoren (covariaten), wat betekent dat het kan helpen om de invloed van één specifieke factor te isoleren terwijl het rekening houdt met de effecten van andere factoren. Bijvoorbeeld: is deze bacterie geassocieerd met LMD of wordt dit door een andere factor beïnvloed?

2) Shotgun metagenomics microbiom analyses: In plaats van zich te concentreren op één specifiek gen, zoals bij 16S rRNA-analyse, kijkt shotgun metagenomics naar al het DNA in het monster. Je ziet niet alleen bacteriën, maar ook andere micro-organismen zoals schimmels en virussen. Daarnaast kan deze methode ook vertellen welke genen en functies de microben hebben. Dit betekent dat ook de functie van deze microben kan worden onderzocht. Om meer ervaring op te doen met het verwerken en analyseren van dit type data, heb ik binnen MRC UNSW samengewerkt op het INTIMET project (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33774848/>).

Samenvatting en uitkomsten

De associatie tussen het darm microbioom en LMD (ERGO)

Hiervoor heb ik data gebruikt van ERGO. Van de 1420 deelnemers met microbioom data, zijn 1372 deelnemers onderzocht op de aanwezigheid van oogaandoeningen zoals LMD. Een voorstadium van LMD werd in 239 deelnemers ontdekt; vroege-intermediaire LMD in 75 deelnemers en late LMD in 6 deelnemers. Verder had ik de beschikking over continue data zoals de grootte van het oppervlak met drusen, reticulaire pseudo drusen, hyperpigmentatie, en pigmentepitheel degeneratie. Deelnemers met en zonder LMD werden op leeftijd, geslacht, en BMI gematcht. Op basis van de aanwezige genera heb ik de alpha- en beta-diversiteit berekend en gevisualiseerd. Vervolgens heb ik associatie analyses uitgevoerd om te onderzoeken of LMD geassocieerd is met veranderingen op genus niveau (N=320). De data zijn genormaliseerd met behulp van “total sum scaling” en de statistische methode die is toegepast is “compound poisson linear model”. De analyses zijn gecorrigeerd voor geslacht, BMI, gebruik van antibiotica, proton-pump inhibitors, cholesterol verlagers, en antidiabetica, reizen, en technische covariaten (vaste effecten). Het gematchte paar-nummer is toegevoegd als random effect.

De resultaten zijn beschreven in bijgevoegd abstract.

Wetenschappelijke uitkomst: Ik heb een abstract ingediend om dit onderzoek te presenteren tijdens het 27^e EVER congres in Valencia, 3-5 November, 2024. Later dit jaar verwacht ik het manuscript ter publicatie aan te bieden.

Samenwerking op INTIMET Project

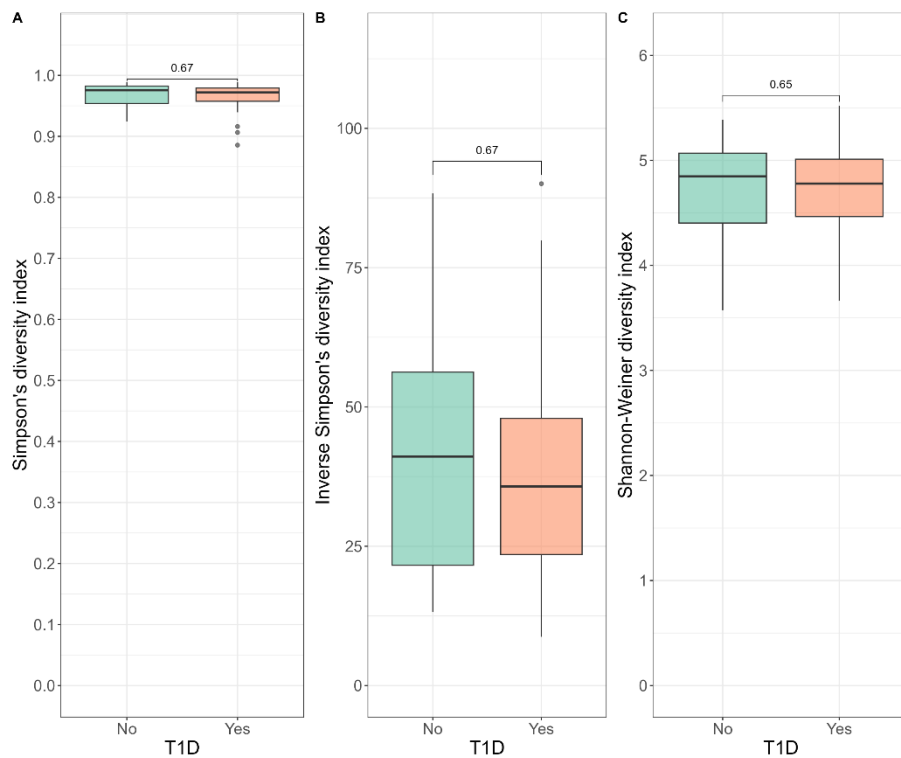
Hiervoor heb ik de eerste analyses uitgevoerd.

1) Verschilt het darm microbioom van type 1 diabetes (T1D) patiënten met dat van gezonde deelnemers?

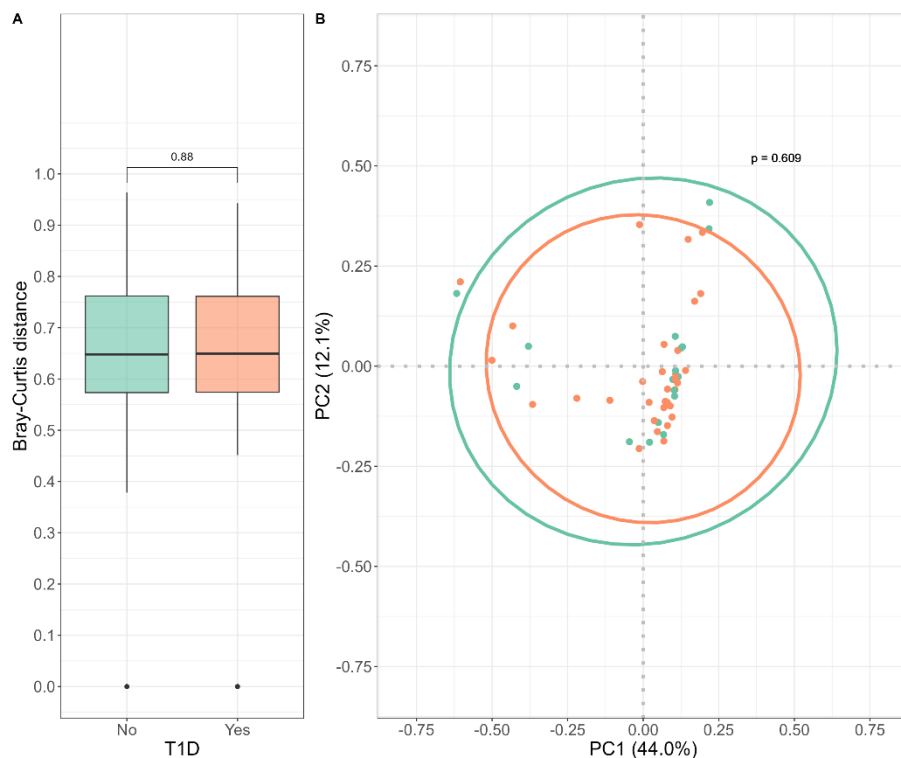
Om deze vraag te beantwoorden heb ik gebruik gemaakt van de baseline samples van het INTIMET project, waarbij 17 samples waren verzameld van gezonde deelnemers en 32 samples van deelnemers met T1D. Op basis van de aanwezige species heb ik de alpha- en beta-diversiteit berekend en gevisualiseerd. Vervolgens heb ik associatie analyses uitgevoerd om te onderzoeken T1D geassocieerd is met veranderingen op species niveau (N=922). De data zijn genormaliseerd met behulp van “total sum scaling” en de statistische methode die is toegepast is “compound poisson linear model”. De analyses zijn gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, en het gebruik van antihypertensiva en statines (vaste effecten).

Op basis van zowel alpha- als beta-diversiteit concludeerde ik dat er, in deze specifieke studie, geen verschil was in het darm microbioom van mensen met en zonder T1D (Figuur 1 en Figuur 2).

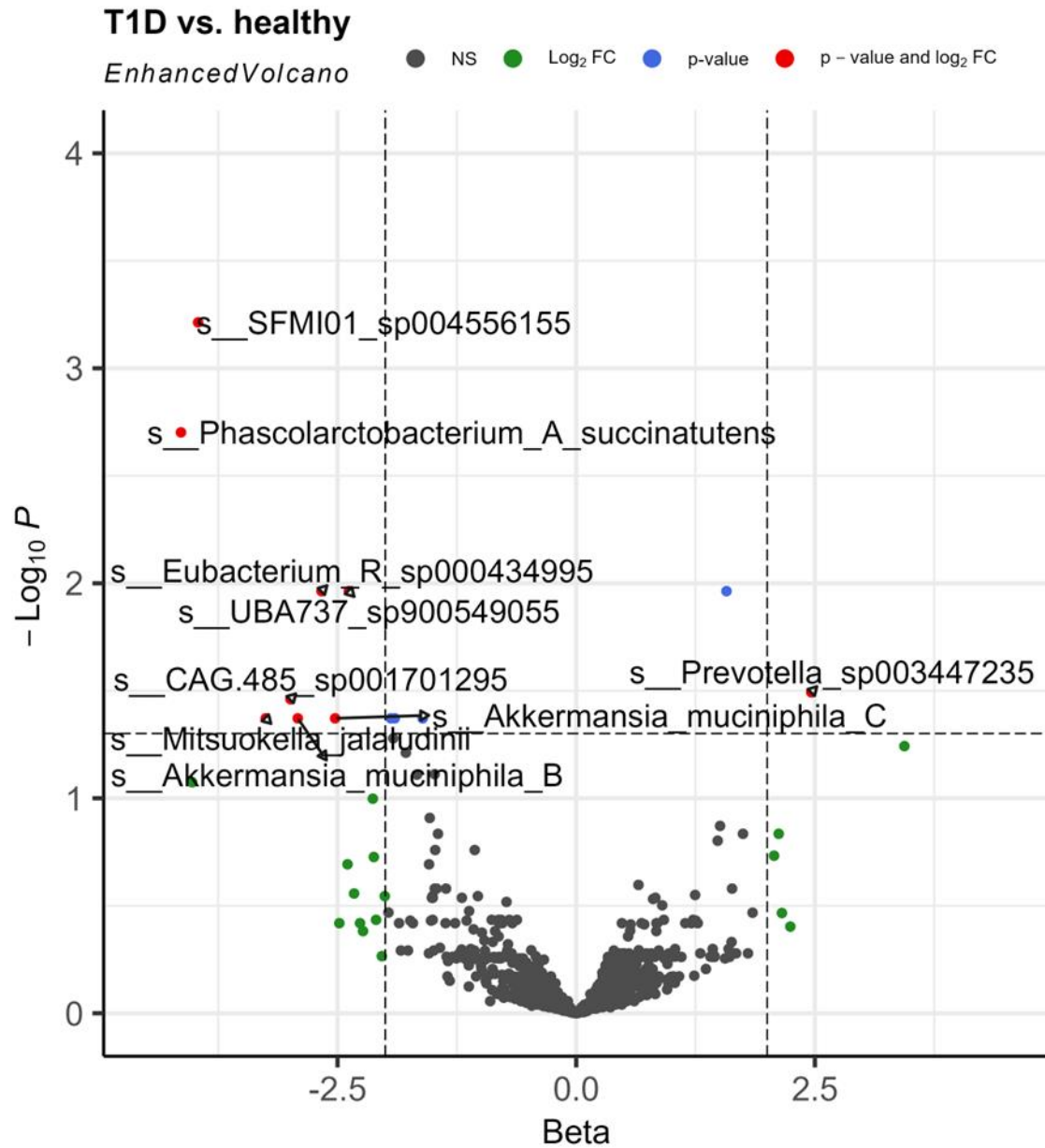
Associatie analyses lieten zien dat er bepaalde taxa lager zijn in het darm microbioom van mensen met T1D (Figuur 3), namelijk: SFMI01 sp004556155, Phascolarctobacterium A succinatutens, Eubacterium R sp000434995, UBA737 sp900549055, CAG.485 sp001701295, Akkermansia muciniphila C, Mitsuoella jalaludinii, en Akkermansia muciniphila B. In de literatuur zijn eerder al associaties beschreven tussen Akkermansia species en T1D, insuline secretie, glucose homeostase, en inflammatie. Akkermansia muciniphila wordt beschouwd als “the next-generation probiotic” om metabole ziekten en inflammatie te verhelpen. Mijn bevindingen sluiten hierbij aan.



Figuur 1. Alpha-diversiteit indices in deelnemers met en zonder T1D. Er lijkt geen verschil te zijn in alpha-diversiteit tussende samples van deelnemers met en zonder T1D.



Figuur 2. Beta-diversiteit in deelnemers met en zonder T1D. Er lijkt geen verschil te zijn in Bray-Curtis distance tussen de samples van deelnemers met en zonder T1D (A). Verder lijkt er ook geen duidelijke clustering te zijn van T1D samples apart van gezonde samples (B).



Figuur 3. Resultaten van associatie analyses met T1D weergegeven als Volcano plot. Bepaalde taxa zijn duidelijk lager (links) in deelnemers met T1D. Deze resultaten zijn gecorrigeerd voor “multiple testing”.

2) Wordt het darm microbioom in T1D patiënten beïnvloed door insuline resistentie, glycemie, en body mass index?

Om deze vraag te beantwoorden heb ik gebruik gemaakt van de baseline samples van het INTIMET project, waarbij ik alleen de 32 samples van deelnemers met T1D heb geanalyseerd. Op basis van de aanwezige species heb ik de alpha- en beta-diversiteit berekend en gevisualiseerd. Vervolgens heb ik associatie analyses uitgevoerd om te onderzoeken T1D geassocieerd is met veranderingen op species niveau (N=922). De methoden zijn zoals voorheen beschreven.

Op basis van zowel alpha- als beta-diversiteit concludeerde ik dat er, in deze specifieke studie, geen effect leek te zijn van insuline resistentie (uitgedrukt als LDSSNEFA) op het darm microbioom van mensen met T1D (Figuur 4 en P PERMANOVA = 0.99). De gevonden associatie met de Inverse Simpson's diversity index lijkt veroorzaakt door één onbetrouwbare waarde. In de associatie analyses was slechts één taxa geassocieerd met LDSSNEFA, namelijk RC9 sp900544195. Dit is een nog onbekende species.

Vergelijkbare resultaten werden gevonden voor glycemie (uitgedrukt als HbA1c levels). Op basis van zowel alpha- als beta-diversiteit concludeerde ik dat er, in deze specifieke studie, geen effect leek te zijn van glycemie op het darm microbioom van mensen met T1D (Figuur 5 en P PERMANOVA = 0.55). De associatie analyses lieten zien dat Hb1Ac geassocieerd is met lagere concentraties van de *Prevotellamassilia* genus en hogere concentraties van de *Prevotella* genus. Dit komt overeen met de literatuur waar genus *Prevotellamassilia* negatief gecorreleerd is met Hb1Ac levels en T2D. Voor genus *Prevotella* is de associatie met Hb1Ac en diabetes nog minder duidelijk beschreven in de literatuur.

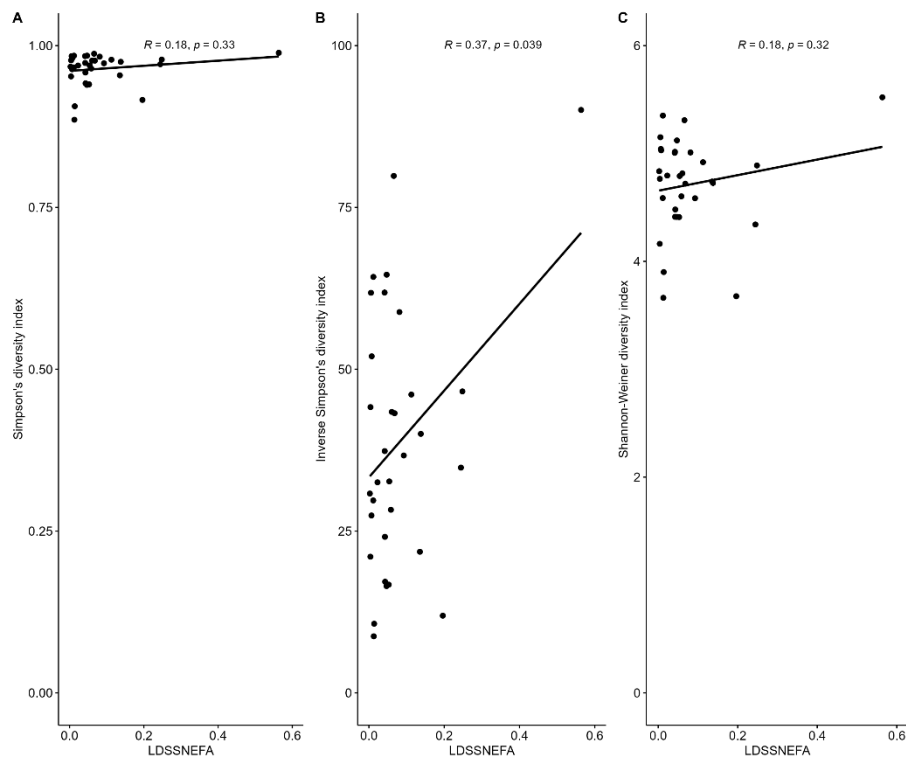
Op basis van zowel alpha- als beta-diversiteit concludeerde ik dat er, in deze specifieke studie, geen effect leek te zijn van BMI op het darm microbioom van mensen met T1D (Figuur 6 en P PERMANOVA = 0.52). De associatie analyses lieten zien dat BMI geassocieerd is met lagere concentraties van een *Akkermansia* species. In de literatuur is eerder beschreven dat hogere concentraties van *Akkermansia* zijn geassocieerd met een lagere kans op obesitas. Mijn bevindingen sluiten hierbij aan.

3) Heeft behandeling van T1D met metformine een significant effect op de samenstelling van het darm microbioom? Zo ja, is dit effect gemedieerd door het GDF-15 verhogende effect van metformine?

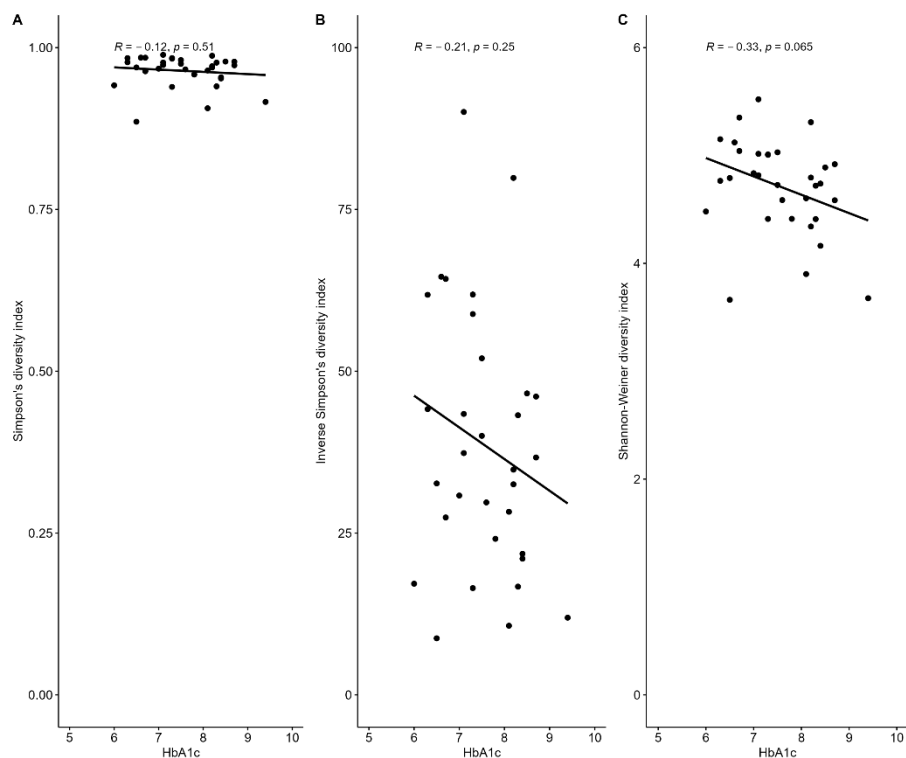
Om deze vraag te beantwoorden heb ik gebruik gemaakt van de baseline samples, samples 6 maanden na behandeling met metformine, en samples 3 maanden na stoppen van metformine behandeling, van het INTIMET project. Op basis van de aanwezige species heb ik de alpha- en beta-diversiteit berekend en gevisualiseerd. Vervolgens heb ik associatie analyses uitgevoerd om te onderzoeken T1D geassocieerd is met veranderingen op species niveau (N=922). De methoden zijn zoals voorheen beschreven.

Op basis van zowel alpha- als beta-diversiteit concludeerde ik dat er, in deze specifieke studie, geen effect leek te zijn van behandeling met metformine op het darm microbioom van mensen met T1D (Figuur 7 en Figuur 8). In de associatie analyses waren slechts twee taxa geassocieerd met metformine behandeling, namelijk CAG 882 sp003486385 en *Ruminococcus F bicirculans*. Mediatie analyse wees uit dat het effect van metformine op deze taxa niet gemedieerd werd door GDF-15.

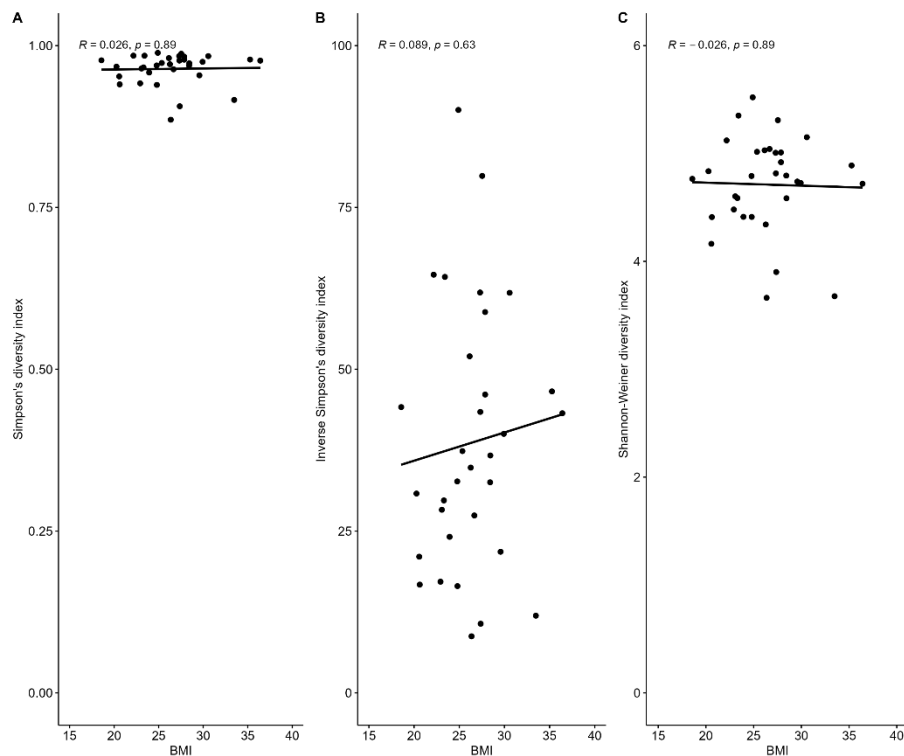
Wetenschappelijke uitkomst: De eerste resultaten zijn verwerkt in een nieuwe grant aanvraag van de hoofdonderzoekers. Wanneer er een artikel zal worden gepubliceerd over dit huidige onderzoek, zal ik daarbij worden opgenomen als de "lead biostatistician/bioinformatician" en coauteur worden.



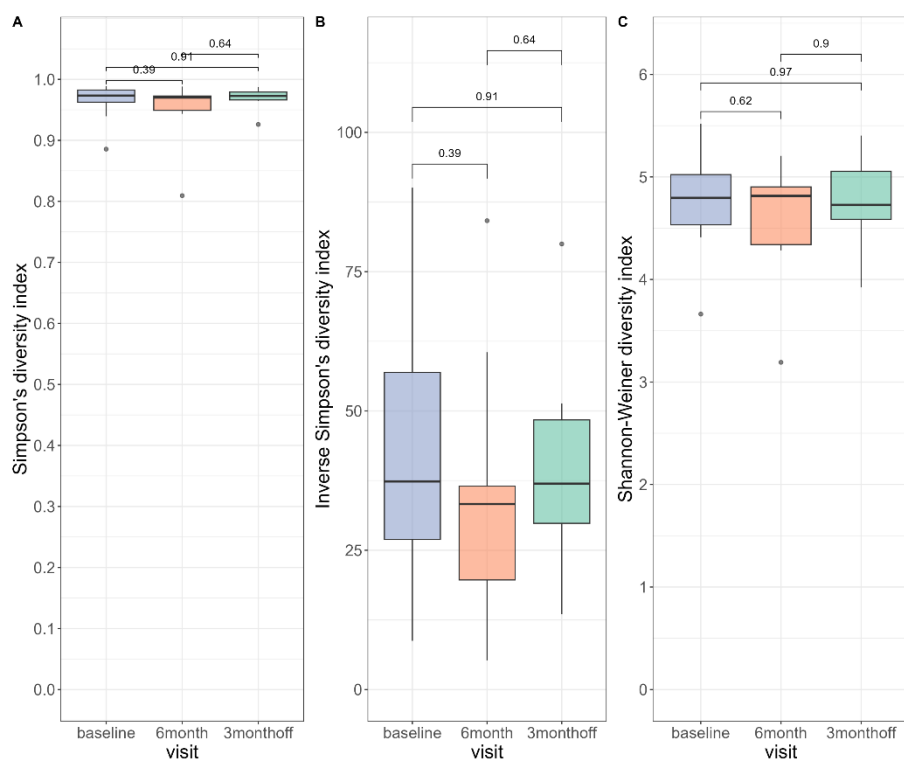
Figuur 4. Correlatie tussen alpha-diversiteit indices en insuline resistentie (LDSSNEFA). Er lijkt geen correlatie te zijn. Er is één onbetrouwbare meting die de correlatie met de Inverse Simpson's diversity index lijkt te beïnvloeden.



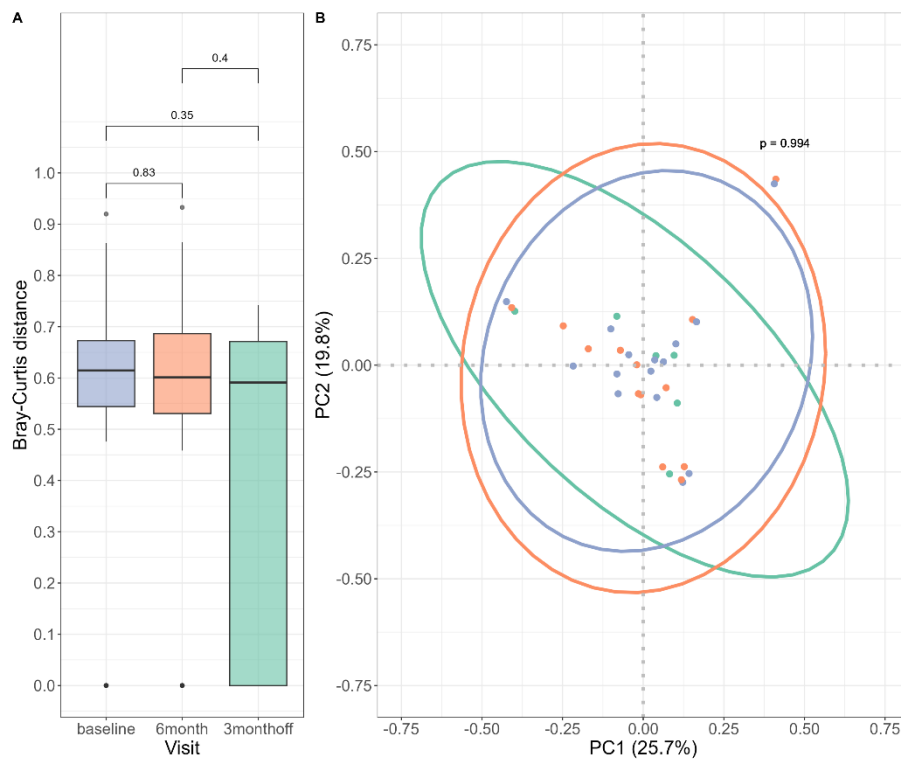
Figuur 5. Correlatie tussen alpha-diversiteit indices en glycemie (Hb1Ac). Er lijkt geen duidelijke correlatie te zijn.



Figuur 6. Correlatie tussen alpha-diversiteit indices en BMI. Er lijkt geen duidelijke correlatie te zijn.



Figuur 7. Alpha-diversiteit indices in deelnemers met T1D op baseline, 6 maanden na metformine behandeling, en 3 maanden na stoppen van metformine behandeling. Er lijkt geen verschil te zijn in alpha-diversiteit tussen de verschillende tijdstippen, en dus metformine behandeling.



Figuur 8. Beta-diversiteit in deelnemers met T1D op baseline, 6 maanden na metformine behandeling, en 3 maanden na stoppen van metformine behandeling. Er lijkt geen verschil te zijn in Bray-Curtis distance tussen de samples van verschillende tijdspunten, en dus metformine behandeling (A). Verder lijkt er ook geen duidelijke clustering te zijn van samples van de verschillende tijdspunten (B).

De associatie tussen het darm microbioom en glaucoom (vervolg, inclusief klinische glaucoom patiënten)

De inclusie is afgerond. We hopen dat de verzamelde samples zo snel als mogelijk verwerkt kunnen worden in het lab. De data van de klinische samples alsmede het nieuwe cohort van ERGO worden later dit jaar verwacht. Dit project zal dus naar alle waarschijnlijkheid in 2025 voortgezet worden, waarna een manuscript ter publicatie zal worden aangeboden.

Samenwerking met onderzoekers van School of Optometry and Vision Science in Sydney

We hebben een aanvraag ingediend voor een IDEAS Grant van de NHMRC (National Health and Medical Research Council) met als titel "Harnessing the ocular microbiota for the treatment of meibomian gland dysfunction and dry eye disease". De uitslag hiervan volgt later dit jaar. Indien de grant wordt toegekend zal ik de rol van "lead biostatistician/bioinformatician" vervullen. Een samenvatting van deze aanvraag heb ik bijgevoegd.

Conclusie

Mijn onderzoeksperiode bij MRC UNSW Sydney heeft mij waardevolle vaardigheden en ervaring opgeleverd in het analyseren van het darm microbioom, zowel met behulp van 16S rRNA- als shotgun metagenomics-technieken. De uitkomsten van mijn onderzoeksprojecten beloven bij te dragen aan ons begrip van oog gerelateerde aandoeningen en de ontwikkeling van nieuwe behandelingsstrategieën op basis van de microbiota.

Gut microbial dysbiosis in age-related macular degeneration

Joëlle Vergroesen^{1, 2}, Jeroen Vermeulen^{1, 2, 3}, Eric Thee^{1, 2, 3}, Bart Liefers^{1, 2, 3}, Caroline Klaver^{1, 2, 3, 4, 5}

¹Erasmus MC University Medical Center, Ophthalmology, Netherlands, ²Erasmus MC University Medical Center, Epidemiology, Netherlands, ³Erasmus MC University Medical Center, EyeNED Reading Center, Netherlands, ⁴Radboud University Medical Center, Ophthalmology, Netherlands, ⁵University of Basel, Institute of Molecular and Clinical Ophthalmology, Switzerland

Purpose: The gut microbiome is highly influential in diseases with inflammatory components. Multiple studies showed a link between the gut microbiome and age-related macular degeneration (AMD). However, no consistent taxa have been reported.

Methods: We included 1372 participants from the Rotterdam Study (RS). AMD features (e.g. [reticular pseudo-]drusen, retinal pigment epithelium degeneration, and hyperpigmentation) were graded by human graders on color fundus photographs. Next, areas of these features were automatically quantified by a deep learning segmentation model. Stages were determined according to the RS classification (preliminary=239, early-intermediate=75, late=6). Propensity score matching was performed on age, sex and BMI. Multivariable associations with taxonomic and functional profiles were assessed using zero-adjusted models (MaAsLin2; Compound Poisson). P-values were false discovery rate-adjusted (q-values). Taxa associated (q<0.25) with at least two out of seven AMD(-related) outcomes are reported.

Results: We observed no associations with alpha- or beta-diversity. Nineteen taxa were associated with AMD, of which 7 persisted after additional adjustment for dietary data. Eubacterium xylanophilum group, Lachnoclostridium, Faecalibacterium, Odoribacter splanchnicus and Parabacteroides distasonis were associated with an AMD phenotype. Parabacteroides and Akkermansia were inversely associated with an AMD phenotype. Moreover, 46 MetaCyc pathways were associated with AMD, of which 15 persisted after additional adjustment for dietary data. GLUCARDEG.PWY, PWY.5028, PWY.5347, PWY.5415, PWY.5532, PWY.5971, PWY.6969 and TCA were associated with an AMD phenotype. FOLSYN.PWY, LEU.DEG2.PWY, PANTO.PWY, PANTOSYN.PWY, PWY.6612, PWY0.1586 and PYRIDNUCSYN.PWY were inversely associated with an AMD phenotype.

Conclusions: Several gut microbiota were associated with an AMD phenotype. AMD pathophysiology might be linked to changes in gut-related metabolic pathways.

Title: Harnessing the ocular microbiota for the treatment of meibomian gland dysfunction and dry eye disease

Synopsis

Dry eye disease is the most common reason for seeking medical eyecare in Australia and affects over 1.9 million people and approximately 800 million people globally. Meibomian gland dysfunction (MGD) is responsible for 85% of dry eye disease cases. MGD is a common condition with no clear aetiology and characterised by inflammatory changes, increased microbial load and/or dysfunction of the lipid producing meibomian glands in the eyelids. This results in tear film instability and leads to symptoms such as visual disturbance, eye irritation and dry eye disease development. Dry eye disease causes significant declines in quality of life including depression, suicidal ideation along with economic losses for individuals and society.

MGD is not curable and existing therapies do not target the cause, with patients dependent on life-long palliative therapies which aim to improve quality of life.

The research team led by CIs Ozkan, Coroneo, Thomas and Willcox have been assessing the biogeography of the bacterial community of the ocular surface, conjunctiva tissue and eyelid margin in health and dry eye disease. Their recent study showed increased abundances of several *Corynebacterium* species (*C. macginleyi*, *C. kroppenstedtii*, *C. acolens*, *C. simulans*) in patients with MGD, suggesting dysbiosis. Of interest, the majority of the species associated with MGD were lipophilic and may be responsible for degradation of the outermost layer of the tear film, a hallmark sign of MGD related dry eye disease.

Due to the difficulty in linking a particular bacterial taxon to MGD causation, the use of metagenomics, metatranscriptomics will permit the entire microbial ecosystem to be viewed as an aetiological agent and allow assessment of microbial community interactions and microbiota-host cross talk.

The proposed project aims to extend this research as follows:

1. Characterise the microbiome (bacterial, viral, fungal) and provide functional insights into the eyelid niche (meibomian gland, meibum secretion, eyelid epidermis, eyelash follicle) microbial communities in patients with MGD compared to controls.
2. Determine whether there are compositional and functional changes to the eyelid niche microbiome following exposure to a range of MGD therapies and whether these changes are correlated with short- and long-term treatment success.
3. Elucidate the genes being expressed in the eyelid niches to understand host-microbe interactions in MGD and controls.

The anticipated outcomes of this project include a greater understanding of the compositional and functional alterations of a healthy microbiome toward a disease-driving configuration and the ability to apply metagenomic approaches to elucidate how microbial communities impact treatment success, which can be translated into improved patient care.

Media Summary

To see the world comfortably and clearly, the surface of our eyes needs to be evenly lubricated with tears. When our eyes become dry due to unstable or insufficient tears, this results in distorted vision, eye irritation and feelings of dry eye, which can be a debilitating medical condition. The primary cause of dry eye disease is meibomian gland dysfunction (MGD) which is not curable and requires life-long therapies to manage the condition. This project aims to understand how the microbiome (bacteria, virus, fungi) that live on us contribute to MGD and whether current therapies alter this microbiome in potentially beneficial directions which could aid in understanding its cause and help clinicians in identifying better treatment options in future.