

Предсказание биологических механизмов влияния кишечных микробов на результаты иммунотерапии меланомы с использованием метагеномных данных

Захаревич Н.В.¹, Морозов М.Д.¹, Канаева В.А.^{1,3}, Иванов А.Б.^{1,2}, Ульяновцев В.И.², Климина К.М.¹, Олехнович Е.И.^{1*}

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

* jeniaole13@mail.ru

Ключевые слова: микробиота кишечника; иммунотерапия рака; меланома; MAG

Мотивация и цель: Мировое научное сообщество проводит масштабные исследования, направленные на определение степени влияния микробиоты кишечника человека на результаты иммунотерапии злокачественных опухолей. Согласно полученным недавно результатам, характеристики микробиоты кишечника человека не только положительно влияют на результаты иммунотерапии, но и могут быть переданы [1–5]. Тот факт, что фенотип ответчика передается при переносе микробиоты, позволяет предположить, что этот феномен может быть связан с конкретной бактерией или набором бактерий (или какой-либо другой бактериальной характеристикой или метаболитом), которые могут быть выделены и использованы в качестве адъюванта для улучшения результатов иммунотерапевтического лечения. Однако, несмотря на большое количество опубликованных исследований, ученые до сих пор не пришли к единому мнению относительно микробных детерминант ответа на иммунотерапию меланомы. Ранее опубликованные метаанализы частично ответили на этот вопрос [6, 7], но полного понимания биологических процессов, лежащих в основе этого явления, пока нет. При этом идентификация бактерий-кандидатов осложняется локальностью собранных когорт, ограничениями по количеству собранных образцов, а также некоторыми другими объективными факторами. Недавно наша исследовательская группа выявила последовательные метагеномные биомаркеры кала, связанные с эффективностью иммунотерапии меланомы, используя общепринятые методы таксономической и функциональной аннотации [8]. Следующим шагом нашего исследования, было использование метагеномики с геномным разрешением, методов сравнительной геномики и метаболической реконструкции для изучения возможных механизмов участия микробиоты кишечника в ответе на терапию метастатической меланомы.

Методы и алгоритмы: В данном исследовании использовались методы биоинформатики, такие как геномно-разрешенная метагеномика, профилирование штаммов, сравнительная геномика и метаболическая реконструкция.

Результаты: Используя загруженные из базы данных NCBI/EBI 680 метагеномов кала из 7 опубликованных исследований пациентов с меланомой [1–5, 7, 9], мы собрали нередуцированный каталог бактериальных геномов (далее metagenome-assembled genomes – MAGs, геномы, собранные из метагеномов), который

включал 1422 MAG'а. Согласно качеству собранных геномов по критериям Genomic Standards Consortium [10], собранный каталог включал 1006 высококачественных и 416 MAG среднего качества. Согласно таксономической аннотации, из всего каталога 1416 являлись геномами бактерий и 6 – геномами архей. Список наиболее распространенных фил включал Firmicutes (902 генома), Actinobacteria (261 геном), Bacteroidetes (148 геномов), Proteobacteria (59 геномов), а также другие филумы (52 генома). После этого было проведено выявление биомаркеров, связанных с результатами иммунотерапии, осуществленное согласно ранее описанному протоколу [8]. В результате проведенного анализа был получен список из 137 MAGs-маркеров, отличающих пациентов по исходу иммунотерапии: 84 для положительного исхода иммунотерапии (R-группа, англ. responder) и 54 для отрицательного (NR-группа, англ. non-responder). В 6 и более исследованиях с положительным исходом иммунотерапии были связаны 5 MAG'ов включая *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium unclassified*, *Gemmiger quicubalis* и *Barnesiella intestinihominis*. Следующим шагом нашей работы стало сравнение выявленных групп биомаркеров по функциональному содержанию в соответствии с классификациями KEGG и MetaCyc [11, 12]. В частности, мы обнаружили 41 группу ортологий по классификации KEGG и 63 по классификации MetaCyc, которые продемонстрировали значительные различия в представленности в группах MAG-биомаркеров. Примечательно, что все эти выявленные группы генов были повышены в R-группе. Результаты анализа обогащения группами генов показал, что 6 путей KEGG и 4 пути MetaCyc, включая связанные с биосинтезом аминокислот и кобаламина, были значительно повышены в R-группе. Кроме того, мы изучили связь между MAG-биомаркерами и вышеупомянутыми путями. Результаты этого анализа позволили выделить 5 родов (*Faecalibacterium*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* и *Ruminococcus*), которые содержали наибольшее количество кластеров генов, относящихся к этим путям.

Используя методы метаболической реконструкции и функциональной аннотации, мы выявили сдвиг баланса прототрофии в сторону ауксотрофии аминокислот у пациентов с негативными результатами иммунотерапии. Кроме того, исследование путей биосинтеза короткоцепочечных жирных кислот, известных своей иммуномодулирующей ролью, выявило дифференциальное обилие этих путей среди конкретных MAG. Среди прочего, наличие кобаламин-зависимого пути синтеза ацетата Вуда–Люнгдала было напрямую связано с позитивным ответом на иммунотерапию меланомы.

Выводы: В целом, полученные нами результаты позволили углубить понимание биологических механизмов влияния микробиома кишечника на результаты иммунотерапии меланомы и заложить основу для дальнейших исследований, направленных на повышение эффективности данного вида лечения с помощью модуляции микробиома.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского Научного Фонда соглашение № 22-75-10029. Информация о проекте доступна по ссылке <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>.

Predicting biological mechanisms of gut microbial influence on melanoma immunotherapy outcomes using metagenomic data

Zakharevich N.V.¹, Morozov M.D.¹, Kanaeva V.A.^{1,3}, Ivanov A.B.^{1,2}, Ulyantsev V.I.², Klimina K.M.¹, Olekhnovich E.I.^{1*}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² ITMO University, Saint Petersburg, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

* jeniaole13@mail.ru

Key words: gut microbiota; cancer immunotherapy; melanoma; MAG

Motivation and Aim: The global scientific community is conducting extensive research to determine the degree of influence of the human gut microbiota on the outcomes of immunotherapy for malignant tumors. Characteristics of the human gut microbiota not only positively influence the outcome of immunotherapy, but can also be transferred [1–5]. The fact that the responder phenotype is transferred by microbiota transfer suggests that this phenomenon may be associated with a specific bacterium or set of bacteria (or some bacterial characteristic or metabolite) that can be isolated and used as an adjuvant to improve the outcome of immunotherapeutic treatment. However, despite a large number of published studies, researchers still do not agree on the gut microbial determinants of response to melanoma immunotherapy. Previously published meta-studies have partially answered this question [6, 7], but a complete understanding of the biological processes underlying this phenomenon remains to be seen. However, the identification of candidate bacteria is complicated by the location and limitations of the samples collected, as well as some other objective factors. Recently, Olekhnovich and co-authors [8] identified consistent stool metagenomic biomarkers associated with melanoma immunotherapy efficacy using community-accepted methods of taxonomic and functional annotation. The next step of our study which we described here is to use enhanced methods including genome-resolved metagenomics, comparative genomics, and metabolic reconstruction methods to explore possible mechanisms of gut microbiota involvement in response to metastatic melanoma therapy.

Methods and Algorithms: This study used advanced bioinformatics techniques such as genome-resolved metagenomics, strain profiling, comparative genomics, and metabolic reconstruction to refine and develop the proposed concepts.

Results: Using our collected from NCBI/EBI database 680 stool metagenomes from 7 published studies from patients with melanoma [1–5, 7, 9], we assembled a non-redundant catalog of bacterial genomes (further metagenome-assembled genomes – MAGs) that included 1,422 genomes. According to the quality of the assembled genomes by Genomic Standards Consortium criteria [10], our genomes included 1,006 high-quality and 416 medium quality MAGs. According to the taxonomic annotation of the entire catalog, 1,416 were bacterial genomes of and 6 were archaeal. The list of the most common phyla includes Firmicutes (902 genomes), Actinobacteria (261 genomes), Bacteroidetes (148 genomes), Proteobacteria (59 genomes), and other

phylums (52 genomes). After that the biomarkers linked to immunotherapy outcome have been evaluated according to early described protocol [8]. As a result of the analysis, we obtained a list of 137 MAGs-biomarkers that distinguished patients by the immunotherapy outcome: 84 for positive immunotherapy outcome (R-group) as well as 54 for negative (NR-group). Consistent in 6 or more studies were 5 MAGs linked to the positive immunotherapy outcome including *Bifidobacterium adolescentis*, unclassified *Bifidobacterium*, *Gemmiger quicibalis*, and *Barnesiella intestinihominis*. The next step in our work was to compare the identified groups of biomarkers by functional content according to KEGG and MetaCyc classifications [11, 12].

Specific gene groups that distinguish functional categories among MAG biomarkers have been identified. Specifically, we found 41 KOG and 63 RXN categories that showed significant differences. Notably, all of these identified gene groups were upregulated in the R-group. The results of gene set enrichment analysis revealed that 6 KEGG pathways, and 4 MetaCyc pathways including associated with amino acid and cobalamin biosynthesis were significantly upregulated in the R-group. In addition, we explored the relationship between MAG-biomarkers and the aforementioned immunotherapy-relevant pathways. The results of this analysis, highlighted the top 5 genera that contained the highest number of gene groups from these pathways. These genera were *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and *Ruminococcus*.

Using metabolic reconstruction and functional annotation methods we identified a shift in the balance of amino acid prototrophy to auxotrophy in patients with negative immunotherapy outcomes. Furthermore, our investigation of the biosynthetic pathways of short-chain fatty acids, known for their immunomodulatory role, revealed a differential abundance of these pathways among the specific MAGs. Among others, the cobalamin-dependent Wood–Ljungdahl pathway of acetate synthesis was directly associated with responsiveness to melanoma immunotherapy.

Conclusion: In summary, our findings have advanced the understanding of the biological mechanisms of gut microbiome influence on melanoma immunotherapy outcome and provided a foundation for further investigations aimed at enhancing immunotherapy efficacy through microbiome modulation. In summary, our findings have advanced the understanding of the biological mechanisms of gut microbiome influence on melanoma immunotherapy outcome and provided a foundation for further investigations aimed at enhancing immunotherapy efficacy through microbiome modulation.

Funding: Financial support for this study was provided by the Russian Science Foundation under the grant number 22-75-10029, available at <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>.

Список литературы/References

1. Frankel A.E., Coughlin L.A., Kim J. et al. Metagenomic shotgun sequencing and unbiased metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients. *Neoplasia*. 2017;19(10):848-855
2. Gopalakrishnan V., Spencer C.N., Nezi L. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359(6371):97-103
3. Matson V., Fessler J., Bao R. et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359(6371):104-108
4. Baruch E.N., Youngster I., Ben-Betzalel G. et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 2021;371(6529):602-609
5. Davar D., Dzutsev A.K., McCulloch J.A. et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021;371(6529):595-602

6. Limeta A, Ji B, Levin M, Gatto F, Nielsen J. Meta-analysis of the gut microbiota in predicting response to cancer immunotherapy in metastatic melanoma. *JCI Insight*. 2020;5(23):e140940
7. Lee K.A., Thomas A.M., Bolte L.A. et al. Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma. *Nat Med*. 2022;28(3):535-544
8. Olekhnovich E.I., Ivanov A.B., Babkina A.A. et al. Consistent Stool Metagenomic Biomarkers Associated with the Response To Melanoma Immunotherapy. *mSystems*. 2023;8(2):e0102322
9. Spencer C.N., McQuade J.L., Gopalakrishnan V. et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. *Science*. 2021;374(6575):1632-1640
10. Bowers R.M., Kyrpides N.C., Stepanauskas R. et al. Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nat Biotechnol*. 2017;35(8):725-731
11. Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M., Sato Y., Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D353-D361
12. Caspi R., Billington R., Keseler I.M. et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes – a 2019 update. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D445-D453