

Поиск универсальных метагеномных маркеров микробиоты кишечника, ассоциированных с ответом на иммунотерапию различных видов рака

Канаева В.^{1, 2*}, Климина К.¹, Олехнович Е.¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

* vera.a.kanaeva@gmail.com

Ключевые слова: кишечная микробиота; метагеномные маркеры; предсказательная модель; иммунотерапия; различные виды рака

Мотивация и цель: Известно, что структура и состав микробиоты кишечника человека влияют на состояние его иммунной системы [1]. Более того, кишечные микробы могут воздействовать на противоопухолевый иммунитет и повышать эффективность иммунотерапии, основанной на ингибировании иммунных контрольных точек. Настоящее исследование направлено на определение универсальных метагеномных маркеров микробиоты кишечника, которые коррелируют с успешностью иммунотерапии при различных видах рака.

Методы и алгоритмы: Для данной работы были загружены метагеномы из 11 опубликованных независимых исследований из открытой базы данных SRA-NCBI. Всего было собрано 814 образцов кишечной микробиоты пациентов, страдающих различными онкологическими заболеваниями, включая меланому, рак желудочно-кишечного тракта (толстой и прямой кишки, поджелудочной железы), рак легких, молочных желез и яичников. 462 образца от пациентов, которые ответили на терапию и 352 от не ответивших.

Для всех образцов проведен контроль качества прочтений (fastQC) и фильтрация человеческой ДНК (kraken2). Первый этап нашей работы заключался в создании избыточного каталога геномов, собранных из метагеномов (metagenome-assembled genome – MAG). Данный процесс включал сборку метагеномных контигов (megahit), биннинг (metabat2, maxbin2), дерепликацию (dRep) собранных метагеномных бинов и их таксономическую (GTDB-TK) аннотацию. Вторым этапом было выявление метагеномных маркеров. Для этого был получен профиль представленности MAG`ов в образцах (InStrain) и проведено ранжирование по степени влияния на исход иммунотерапии (SongBird). Гены, обнаруженные в маркерных геномах, были проаннотированы базой данных KEGG.

Результаты: В результате создания каталога MAG`ов было собрано 3855 операционных геномных единиц (ОГЕ) из которых было выявлено 424 метагеномных маркера: 166 связаны с позитивным исходом лечения, а 258 – с негативным.

Среди маркеров, ассоциированных с отсутствием ответа на иммунотерапию были выявлены патогенные микроорганизмы *Raoultella ornithinolytica*, *Haemophilus_D* и *Klebsiella michiganensis*. *Hungatella effluvii*, чье присутствие в кишечнике

человека связывают с тяжелым течением саркопении [2], также обнаружена в числе отрицательных маркеров. Среди маркеров, ассоциированных с успешным исходом лечения, наиболее часто встречаются *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides uniformis*, *Alistipes putredinis*. Эти виды способствуют увеличению числа симбиотических бактерий в кишечнике, стимулируют сохранение кишечного барьера, обладают иммуномодулирующим действием и ассоциированы с благоприятными исходами лечения различных заболеваний [3–5].

В результате анализа функциональных путей, было установлено, что у пациентов, положительно реагирующих на иммунотерапию, по сравнению с теми, кто не показал ответа, наблюдалось статистически значимое увеличение метаболизма крахмала и сахарозы. Эти вещества активно ферментируются *B. adolescentis*, которая также участвует в ферментации других гликанов [3]. В то же время успешный исход иммунотерапии связан с уменьшением активности пути образования биопленки *Escherichia coli*, которая часто выступает в роли патогенного фактора.

Для построения предсказательной модели использовались данные о логарифмическом отношении относительных представленностей выявленных маркерных ОГЕ в каждом исследуемом образце. Применение модели логистической регрессии позволило спрогнозировать ответ на иммунотерапию на основании лог-отношений для различных видов рака. Разработанная модель продемонстрировала улучшенное качество предсказания по сравнению с традиционными методами таксономической аннотации и относительных представленностей, принятыми в научном сообществе по изучению микробиома.

Выводы: Результаты данной работы создают основу для формирования гипотезы о влиянии микробиоты кишечника на эффективность иммунотерапии рака. Введение нового метода анализа метагеномных данных обеспечивает более детальное описание состава кишечной микробиоты и повышает точность прогнозирования исходов лечения. Это исследование способствует переходу к персонализированной медицине и разработке методов предсказания реакции на иммунотерапию у пациентов с различными видами рака.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ (№ 22-75-10029, <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>).

Search for universal metagenomic markers of the gut microbiota associated with the response to immunotherapy of various types of cancer

Kanaeva V.^{1, 2*}, Klimina K.¹, Olekhovich E.¹

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

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

* vera.a.kanaeva@gmail.com

Key words: intestinal microbiota; metagenomic markers; predictive model; immunotherapy; various types of cancer

Motivation and Aim: It is known that the structure and composition of the human gut microbiota affect the state of the human immune system [1]. Moreover, intestinal microbes can affect antitumor immunity and increase the effectiveness of immunotherapy based on inhibition of immune checkpoints. The present study aims to identify universal metagenomic markers of the gut microbiota that correlate with the success of immunotherapy in various types of cancer.

Methods and Algorithms: For this work, metagenomes from 11 published independent studies from the open SRA-NCBI database were downloaded. A total of 814 samples of the intestinal microbiota of patients suffering from various oncological diseases, including melanoma, cancer of the gastrointestinal tract (colon, rectum, pancreas), lung, breast and ovarian cancers, were collected. 462 samples from patients who responded to therapy and 352 from non-responders.

Reads quality control (fastQC) and human DNA filtration (kraken2) were performed for all samples. The first stage of our work was to create an endless catalog of genomes assembled from metagenomes (metagenome-assembled genome – MAG). This process included the assembly of metagenomic contigs (megahit), binning (metabat2, maxbin2), dereplication (dRep) of the collected metagenomic bins and their taxonomic (GTDB-TK) annotation. The second stage was the identification of metagenomic markers. To do this, a profile of MAGS in the samples (InStrain) was obtained and a ranking was carried out according to the degree of influence on the outcome of immunotherapy (SongBird). The genes found in the marker genomes were annotated by the KEGG database.

Results: The MAG's catalog resulted in the collection of 3,855 operational genomic units (OGEs) of which 424 metagenomic markers were identified: 166 were associated with positive treatment outcome and 258 with negative treatment outcome.

The pathogens *Raoultella ornithinolytica*, *Haemophilus_D* and *Klebsiella michiganensis* were identified among the markers associated with lack of response to immunotherapy. *Hungatella effluvii*, whose presence in the human gut has been associated with the severe course of sarcopenia [2], was also found among the negative markers. Among the markers associated with successful treatment outcome, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bacteroides uniformis*, and *Alistipes putredinis* are the most common. These species promote an increase in the number of symbiotic bacteria in the gut, stimulate the maintenance of the intestinal barrier, have immunomodulatory effects, and are associated with favorable treatment outcomes for various diseases [3–5]. Through functional pathway analysis, it was found that patients who responded positively to immunotherapy, compared to those who did not show a response, showed a statistically significant increase in starch and sucrose metabolism. These substances are actively fermented by *B. adolescentis*, which is also involved in the fermentation of other glycans [3]. At the same time, the successful outcome of immunotherapy is associated with a decrease in the activity of the *Escherichia coli* biofilm formation pathway, which often acts as a pathogenic factor.

Data on the log-ratio of the relative representations of the identified marker OGEs in each study sample were used to build a predictive model. Application of a logistic regression model allowed predicting the response to immunotherapy based on log-ratios for different cancer types. The developed model demonstrated improved prediction quality compared to traditional methods of taxonomic annotation and relative representations accepted in the microbiome research community.

Conclusion: The results of this work provide a basis for the formation of a hypothesis on the influence of the gut microbiota on the efficacy of cancer immunotherapy. The

introduction of a new method of analyzing metagenomic data provides a more detailed description of the composition of the gut microbiota and improves the accuracy of predicting treatment outcomes. This study contributes to the transition to personalized medicine and the development of methods to predict response to immunotherapy in patients with different types of cancer.

Funding: The study is supported by the RSF (No. 22-75-10029, <https://rscf.ru/project/22-75-10029/>).

Список литературы/References

1. Goma E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020;113:2019-2040. doi 10.1007/s10482-020-01474-7
2. Wang Y. et al. Population-based metagenomics analysis reveals altered gut microbiome in sarcopenia: data from the Xiangya Sarcopenia Study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022;13:2340-2351. doi 10.1002/jcsm.13037
3. Leser T., Baker A. Bifidobacterium adolescentis – a beneficial microbe. *Beneficial Microbes*. 2023;14(6):525-551. doi 10.1163/18762891-20230030
4. Yan Y. et al. Bacteroides uniformis-induced perturbations in colonic microbiota and bile acid levels inhibit TH17 differentiation and ameliorate colitis developments. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2023;9(1):56. doi 10.1038/s41522-023-00420-5
5. Parker B. et al. The genus Alistipes: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front Immunol*. 2020;11:906. doi 10.3389/fimmu.2020.00906