Meer begrip van darmrobuustheid

Voorspellen en verbeteren overleving probiotica in darm

Probiotica ontwikkelen en produceren met verbeterde overleving in de darm is een stuk dichterbij gekomen. Een onlangs ontwikkeld technologisch platform geeft inzicht in hoe darmrobuustheid van probiotische lactobacillen wordt bepaald en gereguleerd.

Probiotische lactobacillen dienen de darmpassage te overleven om het beoogde gezondheidsbevorderende effect te verkrijgen. Recent onderzoek heeft gezorgd voor een verbeterd begrip van deze darmrobuustheid en wel specifiek van het modelprobioticum *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Hierdoor kan de effectiviteit van de gezondheidsbevorderende werking van probiotica worden geoptimaliseerd.

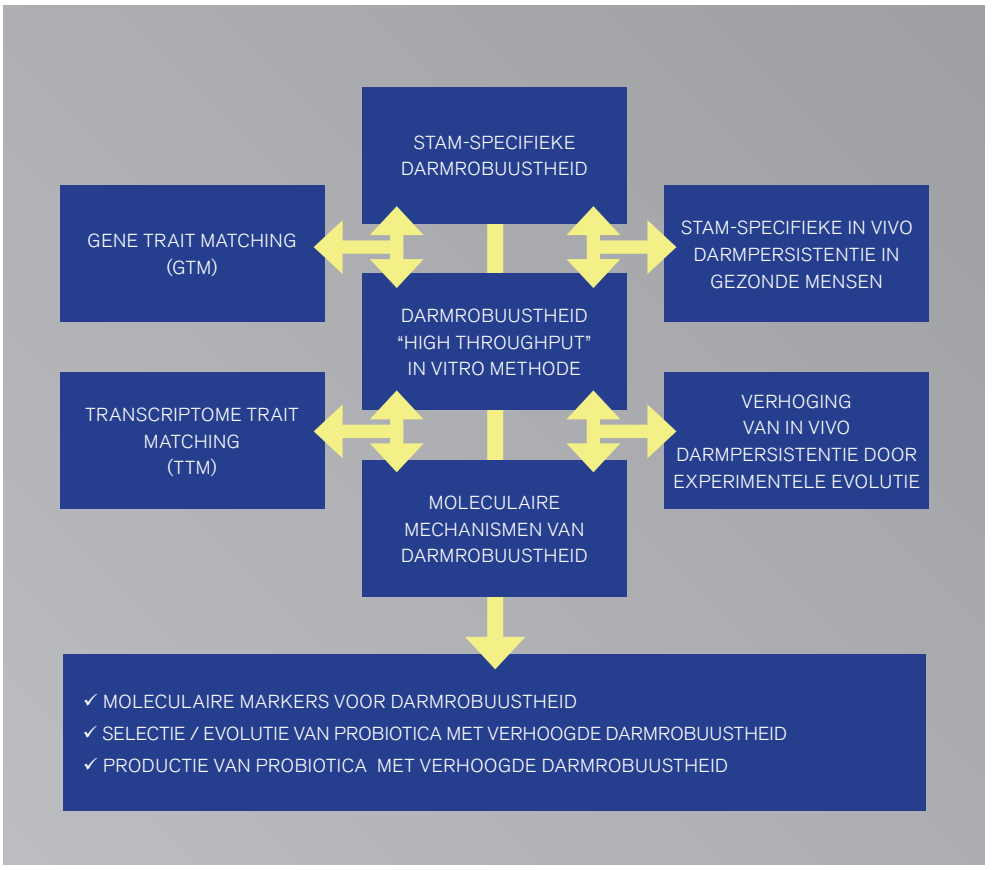
Gezondheidsbevorderend effect probiotica

Melkzuurbacteriën worden in een breed scala van voedselfermentaties toegepast, waar de melkzuurvorming bijdraagt aan de houdbaarheid van het voedingsmiddel. Daarnaast draagt bacteriële fermentatie bij aan essentiële eigenschappen van deze producten, zoals smaak en textuur. Naast deze productiegerichte toepassingen worden melkzuurbacteriën ingezet als gezondheidsbevorderende ingrediënten in voedingsmiddelen en voedingssupplementen. Veel van deze probiotische producten bevatten lactobacillen als het actieve, gezondheidsbevorderende ingrediënt. De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) heeft probiotica gedefinieerd als 'levende micro-organismen die bij toepassing in de juiste dosis een gezondheidsbevorderend effect teweegbrengen in de gebruiker'. De voornaamste toepassing van probiotica is gericht op effecten in de darm van de consument. Om die reden is het van belang beter te begrijpen hoe probiotische lactobacillen in staat zijn de darmpassage te overleven. Vanuit die kennis zijn scenario's te ontwikkelen om de overleving van probiotica in de menselijke darm te verbeteren en daarmee de effectiviteit ervan te verhogen.

Darmrobuustheid verhogen

Probiotische lactobacillen die levend in onze darm dienen te arriveren, moeten een aantal uitdagingen overwinnen. Allereerst is er de passage van de maag, waar zeer zure omstandigheden moeten worden doorstaan (pH circa 2,5). Na aankomst in de dunne darm worden de bacteriën blootgesteld aan de oppervlakte-actieve componenten in gal en de verteringsenzymen die worden aangemaakt door de alvleesklier, terwijl er daarnaast grote aantallen micro-organismen in de darm aanwezig zijn die concurreren voor de aanwezige nutriënten. Al met al, geen sinecure voor de probiotica om deze stresscondities te doorstaan, maar wel een voorwaarde om uiteindelijk de interacties met het darmslijmvlies aan te kunnen gaan die het beoogde gezondheidseffect opleveren. Om de overleving van probiotische bacteriën in de darm te kunnen bestuderen, is er bij NIZO food research (in het kader van TI Food and Nutrition) een efficiënte methode ontwikkeld om in het laboratorium (*in vitro*) in 'high-throughput' de bacteriële overleving te meten onder condities die de darm nabootsen.
De methode omvat twee stadia van stressexpositie, waarbij de bacteriën eerst een uur worden blootgesteld aan pH 2,5, gevolgd door pH neutralisatie en een uur blootstelling aan fysiologische concentraties van gal en alvleesklierenzymen. Gedurende de twee uur durende procedure worden op gezette tijden monsters genomen waarin de overleving van de bacteriën wordt bepaald door een simpele telling van het aantal overlevende cellen ('colony forming unit'-(CFU) bepaling) (1). Deze bepaling neemt een centrale rol in binnen het onderzoek waar de darmrobuustheid van het model probioticum *Lactobacillus plantarum* WCFS1 is onderzocht (figuur 1). Gekoppeld aan deze methode is met verschillende benaderingen bepaald welke moleculaire reacties in *L. plantarum* bijdragen aan darmrobuustheid en in hoeverre deze eigenschap valt te verbeteren met robuustheid verhogende kweekmethoden, of via experi- →

WETENSCHAP



Figuur 1. Schematische weergave van de onderzoekscenario's die zijn toegepast binnen het darmrobuustheidsonderzoek met *L. plantarum* WCFS1. Deze generieke combinatie van kennis van soort-diversiteit en moleculaire mechanismen biedt universele mogelijkheden tot robuustheidsverbeteringen.

mentele evolutie. Daarnaast is de methode gebruikt om de diversiteit in darmrobuustheid in *L. plantarum* stammen te onderzoeken om de meest robuuste stammen te selecteren.

Stressadaptatie

Bacteriën kunnen zich aanpassen aan stresscondities door de expressie van genen die bijdragen aan stresstolerantie. Een deel van die genen speelt een rol bij de overleving van verschillende vormen van stress (generieke stressrespons) terwijl andere genen specifiek bijdragen aan overleving van één specifieke stresconditie. De strikt gecoördineerde en gereguleerde expressie van deze verschillende stressgenen is van groot belang om tolerantie te verhogen en wordt gereguleerd door een complex regulatienetwerk met verschillende regulatoreiwitten.

In *L. plantarum* wordt, net als in veel andere bacteriën, de generieke stressrespons o.a. gereguleerd door twee centrale regulatoren, HrcA en CtsR, die respectievelijk de klasse I (chaperon functies als GroELS en DnaKJ) en klasse III (verwijdering van foutief gevouwen eiwitten door het Clp protease complex) stressrespons controleren (2). Mutagenese van één of beide van deze regulatoren geeft grote veranderingen van het genexpressieprofiel in *L. plantarum*, waarbij bekende stressgerelateerde, maar ook vele andere genen verhoogd of verlaagd tot expressie komen (3). De HrcA-CtsR mutanten vertonen een verhoogde robuustheid onder een aantal stresscondities, zoals groei bij verhoogde temperatuur en blootstelling aan oxidatieve (waterstofperoxide) stress. Geen van beide mutanten vertoonde echter een verhoogde darmrobuustheid in de *in vitro* methode, wat aangeeft dat deze generieke stressrespons geen beslissende bijdrage levert aan de darmrobuustheid (3).

Om te achterhalen welke genen dan wel een bepalende bijdrage leveren aan de darmrobuustheid in *L. plantarum* WCFS1, werd de bacterie op een dertigtal verschillende manieren gekweekt waarbij in alle verkregen cultures zowel het genexpressieprofiel als de darmrobuustheid werden gemeten (4,5). Hieruit bleek dat de kweekmethode een grote invloed had op de robuustheid (ca. 10 miljoen keer verschil tussen de beste en slechtst overlevende cultuur). Het kweken van de bacterie in media met een verhoogd zoutgehalte had een negatief effect op de darmrobuustheid, terwijl het kweken bij verlaagde pH de robuustheid van de bacteriën juist verbeterde (5). Dit toont aan dat door verandering van de productiemethode van probiotische bacteriën de overleving in de darm is te verbeteren. Daarnaast konden door kwantitatieve correlatieanalyse van de expressie van specifieke genen en de gemeten darmrobuustheid ('transcriptome trait matching'; zie figuur 1) een aantal genen worden geïdentificeerd die geassocieerd zijn met darmrobuustheid. Deze genen waren nog niet bekend als stressrespons genen en hadden alle een (indirecte) functie in de opbouw van de bacteriële celwand. Hieruit blijkt dat de architectuur van de celwand van lactobacillen een belangrijke rol speelt in darmrobuustheid (5).

Voorspellende waarde

De variatie in fenotypes gemeten voor verschillende stammen van de soort *L. plantarum* is hoog (6). Om die reden is het relevant om bij de selectie van probiotische lactobacillen de darmrobuustheid van een collectie aan stammen te testen. Dit werd gedaan voor 42 *L. plantarum* stammen en de gemeten verschillen in overleving waren opvallend groot (circa 1 miljoen keer verschil tussen de best en slechtst overlevende stam) (1). Dit geeft aan dat deze meting relevant is bij de selectie van nieuwe probiotische stammen.

De *in vitro* gemeten darmrobuustheid werd gevalideerd door de feitelijke darmpersistentie *in vivo* in gezonde mensen te bepalen voor ongeveer de helft van deze *L. plantarum* stammen. In deze humane test werden zo'n tien stammen parallel getest in één proefpersoon in een competitiemodel. Hierbij bleken de *in vitro* en *in vivo* gemeten relatieve darmrobuustheid van de verschillende *L. plantarum* stammen kwalitatief goed overeen te komen. De *in vitro* methode versterkte het verschil tussen de stammen dat werd gemeten *in vivo*. Deze metingen bevestigen de voorspellende waarde van de snelle en eenvoudige *in vitro* methode voor darmrobuustheid (1).

'De kweekmethode heeft een grote invloed op de robuustheid van bacteriën'

Experimentele evolutie

Naast adaptatie door genregulatie, kunnen bacteriën zich op een langere tijdschaal ook aanpassen aan omgevingsstress door adaptieve evolutie. Mutanten van de oorspronkelijke stam die (at random) ontstaan, kunnen door een verbeterde fitheid in de betreffende omgeving de overhand in de populatie krijgen. Hierdoor zijn ze te isoleren en bestuderen. Genoomsequentiebepaling is een directe manier om de mutaties in een verkregen variant op te sporen, waardoor de onderzoekers inzicht krijgen in de moleculaire aanpassingen die bijdragen aan het evolutionaire voordeel van de stam. Hiermee kunnen bijvoorbeeld de aanpassingen worden aangetoond die een rol spelen in de verbetering van de groei in melk van melkzuurbacteriën, die oorspronkelijk zijn geïsoleerd van plantenmateriaal (7).

Een experimentele evolutiestrategie werd toegepast om de persistentie van *L. plantarum* WCFS1 in de darm te verlengen. Om varianten te selecteren met een verhoogde darmpersistentie, werd *L. plantarum* WCFS1 blootgesteld aan de repetitieve passage door de muisdarm, waarbij steeds de langst verblijvende *L. plantarum* cellen werden geïsoleerd. Zo werden varianten van de WCFS1 stam geïsoleerd die meer dan een drievoudig verlengde persistentie in de darm vertoonden (8). De genoom-sequentie van deze varianten bevatte enkele tientallen veranderingen ten opzichte van de oorspronkelijke stam, die opvallend vaak werden aangetroffen in genen die coderen voor celwand geassocieerde functies (8). Dit bevestigde opnieuw de eerder veronderstelde relatie tussen bacteriële celwand architectuur en darmrobuustheid.

Platform voor verbetering robuustheid

De resultaten bieden scenario's voor de gerichte verbetering van darmrobuustheid door:

1. De selectie van robuustere stammen;
2. De gerichte aanpassing van de productiemethode voor probiotica aan de hand van moleculaire robuustheidmarkers;
3. Experimentele evolutie door repetitieve darmpassage.

Het onderzoek heeft daarnaast ook methoden opgeleverd die generiek inzetbaar zijn in een platform van technologieën gericht op de verbetering van stressrobuustheid van bacteriën.Te denken valt dan aan andere vormen van stress zoals hittebehandeling, lage pH en oxidatieve agentia.

REFERENTIES

1. van Bokhorst-van de Veen H, van Swam I, Wels M, Bron PA, Kleerebezem M. 2012. Congruent strain specific intestinal persistence of Lactobacillus plantarum in an intestine-mimicking in vitro system and in human volunteers. PLoS One. 7:e44588.
2. Bron P A, van Bokhorst-van de Veen H, Wels M, Kleerebezem M. 2011. Engineering robust lactic acid bacteria. In Stress Responses of Lactic Acid Bacteria (pp. 369-394). Springer US.
3. van Bokhorst-van de Veen H, Bongers RS, Wels M, Bron PA, Kleerebezem M. 2013. Transcriptome signatures of class I and III stress response deregulation in Lactobacillus plantarum reveal pleiotropic adaptation. Microb. Cell Fact. 12:112.
4. Bron PA, Wels M, Bongers RS, van Bokhorst-van de Veen H, Wiersma A, Overmars L, Marco ML, Kleerebezem M. 2012. Transcriptomes reveal genetic signatures underlying physiological variations imposed by different fermentation conditions in Lactobacillus plantarum. PLoS One. 7:e38720.
5. van Bokhorst-van de Veen H, Lee IC, Marco ML, Wels M, Bron PA, Kleerebezem M. 2012. Modulation of Lactobacillus plantarum gastrointestinal robustness by fermentation conditions enables identification of bacterial robustness markers. PLoS One. 7:e39053.
6. Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A, Wels M, Phan HT, Rademaker JL, Starrenburg MJ, Kleerebezem M, Molenaar D, van Hylckama Vlieg JE. 2010. Phenotypic and genomic diversity of Lactobacillus plantarum strains isolated from various environmental niches. Environ. Microbiol. 12:758-73.
7. Bachmann H, Starrenburg MJ, Molenaar D, Kleerebezem M, van Hylckama Vlieg JE. 2012. Microbial domestication signatures of Lactococcus lactis can be reproduced by experimental evolution. Genome research 22:115-124.
8. van Bokhorst-van de Veen H, Smelt MJ, Wels M, van Hijum SA, de Vos P, Kleerebezem M, Bron PA. 2013. Genotypic adaptations associated with prolonged persistence of Lactobacillus plantarum in the murine digestive tract. Biotechnol J. 8:895-904.
9. Bron PA, Kleerebezem M. 2011. Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. Bioeng. Bugs 2:80-87.
10. Bron PA, van Baarlen P, Kleerebezem M. 2012. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. Nature Rev. Microbiol. 10:66-78.

▪ MICHIEL KLEEREBEZEM EN PETER BRON ▪

M. Kleerebezem, P. Bron, NIZO food research, michiel.kleerebezem@nizo.com, peter.bron@nizo.com