

DISS. ETH NO. 20235

ASSESSMENT OF DIETARY MODULATION ON THE GUT MICROBIOTA OF OBESE AND
NORMAL-WEIGHT CHILDREN USING A COMBINED *IN VIVO* AND *IN VITRO* SYSTEMS
BIOLOGY MODELING PLATFORM

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

AMANDA NICOLE PAYNE

M.S. in Applied Biology.

Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA (USA)

Born October 30, 1980

El Paso, TX (USA)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Prof. Dr. Luc Tappy, co-examiner

Prof. Dr. Michael Zimmermann, co-examiner

Dr. Christophe Chassard, co-examiner

2012

Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurde weltweit eine starke Zunahme der Häufigkeit von Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen sowie auch bei Kindern festgestellt. Adipositas (auch Fettleibigkeit, Fettsucht oder Obesitas genannt) bezeichnet ein starkes Übergewicht, das durch eine über das normale Mass hinausgehende Vermehrung des Körperfettes mit krankhaften Auswirkungen gekennzeichnet ist. Nach der WHO-Definition wird Adipositas einem Körpermasseindex (BMI) von über 30 kg/m² zugeteilt. Der BMI wird anhand der Grösse und des Gewichts berechnet, wird aber bei Kindern wegen Wachstumsunterschiede zwischen Mädchen und Buben anders eingestuft und bezieht sich auf vorgegebenen Tabellen der WHO und der amerikanischen Centers for Disease Control (CDC). Die Ursache für Adipositas wird meist in der Ernährung oder Bewegung gesucht, jedoch wurde aber wissenschaftlich vermehrt gezeigt, dass auch andere Faktoren eine Rolle spielen können. In 2005 demonstrierte Ley *et al.* dass sich die Darmflora von normal-gewichtigen Erwachsenen von derjenigen von übergewichtigen unterscheidet mit Identifizierung von einem erhöhten Anteil von *Firmicutes* gegenüber *Bacteroidetes* Stämmen in übergewichtigen Probanden. Die Bedeutung dieser Anteil von *Firmicutes* und *Bacteroidetes* wurde in zwischen mehrfach umstritten dennoch wurden Unterschiede in der Beteiligung des Stoffwechsels zwischen normal- und übergewichtigen vermehrt demonstriert. Zudem wurde die Bildung erhöhten Mengen von Stoffwechselprodukten, vor allem die kurzkettigte Fettsäuren Acetat, Butyrat und Propionat, bei übergewichtigen beachtet. Diese Fettsäuren entstehen bei der bakteriellen Abbau von ballaststoffreichen Kohlenhydraten in dem Dickdarm, wobei die zugeführte Energie unter Umständen nicht von allen Personen gleich verwertet wird.

Ein mitwirkender Faktor bei der Entstehung von Adipositas ist die Änderung unserer Diäten, gekennzeichnet bei einem Zuwachs an zucker- und fettreiche Produkte und reduzierte Mengen ballaststoffreiche Lebensmitteln. Insbesondere wurde eine Zunahme von Fruktose und fix-fertig, kohlenhydratreiche Produkte in übergewichtigen gegenüber normalgewichtigen Kindern festgestellt. Trotz der überwiegenden Daten welche auf einer diät-beeinflussten Rolle der Darmflora in Adipositas hindeuten, wurde dieser Zusammenhang in Kindern bis anhin nicht gründlich untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Systembiologie-Modell erfasst um die Gesamtheit der Prozesse in Zusammenhang mit Adipositas, Fruktose und die Darmflora in normal- und übergewichtigen Kindern zu untersuchen. Dieses Systembiologie-Modell besteht aus vier komplementäre Komponenten: eine

klinische Studie mit normal- und übergewichtigen Kindern, ein *in vitro* Fermentationsmodell, ein kombiniertes *in vitro* Darmzellen-Fermentationsmodell und ein *in vivo* Tiermodell. Die Besonderheit dieser unterschiedliche aber komplementäre Modelle liegt in dem fortgeschrittenen Grad der Systembiologie Methoden verwendet und die Komplexität der erhaltenen Daten.

In unserer klinischen Studie in Zusammenarbeit mit der Kinderspital St. Gallen wurde die Zusammensetzung (qPCR) sowie auch die Aktivität (HPLC) der Darmbakterien in normal- und übergewichtige Kinder untersucht. In Gegensatz zu den Resultaten in Erwachsenen welche auf einer erhöhten Anteil von *Firmicutes* gegenüber *Bacteroidetes* zeigten, konnten keine signifikante Unterschiede in 9 bakteriellen Gruppen zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Vergleichsweise wurde jedoch eine signifikante und erhöhte metabolische Aktivität in übergewichtigen Kindern beobachtet. Höhere Mengen der kurzkettigen Fettsäuren Butyrat und Propionat wurden in den übergewichtigen Probanden gemessen, hingegen wurde ein grösserer Beitrag an intermediär Metaboliten sowie Lactat beobachtet. Diese Resultate stimmen mit bisherigen Studien, welche einen erhöhten Stoffwechsel in übergewichtiger Darmflora demonstrierten, überein. In dem zweiten Teil meines Systembiologie-Modells, wurde während 42 Tagen der Einfluss verschiedener Diäten auf die Zusammensetzung und Aktivität der Darmflora in einem kontinuierlichen, dreistufigen Fermentationsmodell untersucht. Dieses dreistufige Fermentationsmodell wurde erfasst um den aufsteigenden (pH 5.5), querlaufenden (pH 6.2) und den absteigenden (pH 6.8) Abschnitt des Dickdarms zu simulieren und wurde mit immobilisierten Fäkalproben von je einem normal- und übergewichtigen Kind angeimpft. Drei verschiedene Fermentationsmedien, reflektierend der Diäten eines übergewichtigen (HE), normalgewichtigen (NE) und magersüchtigen (LE) Kindes, wurden anhand publizierte Ernährungsverhalten der drei Gruppen kreiert. Diese Fermentationsmedien wurden dem Fermentationsmodell und die darin immobilisierten Darmbakterien während separate Fermentationsperioden sequenziell zugeführt. Die HE Fermentationsmedium führte vor allem zu erhöhten Butyrat Produktion in normal- sowie auch übergewichtigen Kindern aber mit unterschiedlicher Stimulierung der Buytrat-produzierende *Clostridium* Cluster XIVa in den beiden Modellen. Lactat-bedingte, Butyrat-produzierende *E. hallii* wurde in der übergewichtigen und Actetat-bedingte, Butyrate-produzierende *Roseburia* / *E. rectale* in der normal-gewichtigen Darmflora stimuliert. Der umgekehrte Effekt wurde während Zufluss des NE Media beobachtet, hingegen reagierten beide Darmflora ähnlich während Fermentation des LE (Magersüchtigen) Media.

Zusammenfassung

Eine Kritik solcher *in vitro* Fermentationsmodellen bezieht sich auf die Abwesenheit der Interaktionen zwischen Wirt und Mikroorganismen. Um die Fähigkeit verschiedener Diäten die Interaktionen zwischen Wirt und Mikroorganismen beeinflussen zu können, wurde ein kombiniertes *in vitro* Darmzell-Fermentationsmodell erfasst. Dieses Modell verfügt über Mukus absondernde HT29-MTX Darmzellen welche mit Ausflüsse der verschiedenen Reaktoren des Dreistufigen-Dickdarm Fermentationsmodells behandelt wurden. Veränderungen des Immunsystems in Folge der Zusammensetzung der Darmflora oder metabolische Aktivität während verschiedener Energiestatus wurden anhand verschiedener Zytokin Absonderung gemessen. Im Weiteren wurden Veränderungen in der Epithelintegrität mittels der Transepithelialen Elektrischen Resistenz (TER) gemerkt. Die Art der Immunresonanz unterschied sich zwischen der normal- und übergewichtigen Darmflora. Absonderung der Zytokinen IL-2, IL-6, IL-8 und IL-10 wurde bei mit normal-gewichtigem Ausfluss behandelten HT29-MTX gemessen, welches auf eine proinflammatorische Reaktion hindeutet. Nur die Absonderung von IL-1Ra bei mit übergewichtigem Ausfluss behandelten HT29-MTX Darmzellen wurde beobachtet. Dieser Unterschied einer Zytokin-Absonderung wurde auf Verschiedenheiten in der Zusammensetzung der beiden Darmflora zugeschrieben. *Lactobacillus* wurde in der normal-gewichtigen Darmflora konstant gemessen, erschien aber erst während LE Fermentation in der übergewichtigen Darmflora. Obwohl sich diese Beobachtung auf nur eine bakterielle Gruppe bezieht, deutet sie auf andere mögliche aber unentdeckte kompositionelle Unterschiede als Ursache hin. In Gegensatz zu Immunreaktivität, reagierte TER auf die zugeführte, simulierte Diät. Fermentationsauflüsse der HE Fermentationsperiode, gefasst mit hohen Mengen Butyrat sowie Fermentationsauflüsse der LE Fermentationsperiode, führten zu dem grössten Anstieg der TER in beiden Fermentationsmodellen.

Schlussendlich wurde die Gesamtheit dieser *in vitro* Resultate mittels einer *in vivo* Tiermodell getestet. Zwanzig männliche Fisher Raten wurden in zwei 10-er Gruppen eingeteilt und mit der Darmflora von entweder einem normal- oder übergewichtigen Kind konventionalisiert. Die beiden Gruppen wurden danach in einer Fruktose- oder Kontrol-Gruppe von je 5 Tieren aufgeteilt. Die Einnahme von Fruktose wurde mit höheren Gewichtszunahme und Körperfettanteil verbunden, vor allem in normal-gewichtigen, konventionalisierten Tieren. Höhere Mengen an Leptin und Adiponectin wurde mit der Einnahme von Fruktose assoziiert. Auch ein Beginn von der mit Adipositas-assoziierten Entzündung wurde in den übergewichtigsten konventionalisierten Tieren gemerkt, gekennzeichnet bei hohen CRP Mengen in Blut. Die Zusammensetzung der Darmflora reagierte ebenfalls auf die Zufuhr von Fruktose

mit der Beobachtung einer Dysbiose der Butyrat-produzierende Bakterien, gekennzeichnet bei der Stimulierung von den Lactat-nutzenden *E. hallii* und Reduktion von den Acetat-nutzenden *Roseburia* / *E. rectale* und *F. prausnitzii*. Im Weiteren wurde eine Beziehung zwischen den Lactat-produzierenden, Milchsäuren Bakterien *Lactobacillus* und *Bifidobacteria* und andere Lactat-nutzende Spezies sowie *Veillonella* und Sulfat-reduzierende Mikroorganismen beobachtet. Fruktose-abhängige metabolische Aktivität war am höchsten in normal-gewichtigen, konventionalisierten Tieren obwohl die gesamte metabolische Aktivität bei den übergewichtigen, konventionalisierten Tieren am höchsten war. Diese Resultate deuten auf eine metabolische und Lactat-abhängige Nische, dominiert bei Milchsäuren Bakterien welche die Zusammensetzung weiter beeinflussen. Der Grad der Dysbiose war vermindert in übergewichtigen, konventionalisierten Tieren, vorschlagend auf eine Art Kondition der übergewichtigen Darmflora zu Komponenten eines überwichtigen Diäts, wie beispielsweise Fruktose. Normal-gewichtigen, konventionalisierten Tieren demonstrierten hingegen eine hohe metabolische Reaktion und Dysbiose als mögliche Adaption zu einem „unbekannten“ Substrat.

Zusammenfassend wurde in der vorliegende Arbeit ein kombiniertes Systemsbiologie-Modell erstellt um die Gesamtheit der Prozesse in Zusammenhang mit Adipositas, Fruktose und die Darmflora in normal- und übergewichtigen Kindern zu untersuchen. Eine Fruktose-abhängige Dysbiose in Butyrat-produzierende Mikroorganismen sowie auch erhöhte metabolische Aktivität wurde *in vitro* sowie auch *in vivo* beobachtet. Die Gesamtheit der Resultate schlagen eine nötige Reaktion einer normal-gewichtigen Darmflora vor, als Antwort zu einer Zufuhr von westlichen Diäten und deren Komponenten. In Gegensatz wurde eine Art erworbene Kondition der übergewichtigen Darmflora beobachtet, gekennzeichnet bei einem geringeren Mass der Adaptation zu westlichen Diäten und deren Komponenten sowie Fruktose. Die Kombination von verschiedenen und in ihrer Komplexität ausgezeichneten Modellen und deutet auf eine solide Gestaltung der Modelle hin und kann durchaus in zukünftige Versuche der Einfluss verschiedene Faktoren auf die Zusammensetzung und metabolische Aktivität der Darmflora eingesetzt werden.

Summary

Obesity has reached a worldwide epidemic status affecting both children and adults as well as developing and Western nations. Obesity is defined as excessive or abnormal body fat accumulation that presents a risk to health and is measured using the Body Mass Index (BMI), with a BMI of 25 – 30 defined as overweight and a BMI >30 classified as obese. Classification of obesity in children is more complex, defined according to specific age and gender-defined growth charts given by both the WHO and U.S. Centers for Disease Control. Increased energy intake coupled to reduced physical activity and energy expenditure constitutes the major cause of obesity however, other factors have more recently been ascribed as potentially influential in the development and maintenance of an obese phenotype. In 2005 Ley *et al.* described the possibility of compositional differences with our commensal gut microflora as a contributory factor in obesity, with the observation of an increased *Firmicutes* : *Bacteroidetes* ratio identified in obese subjects. The overall relevance of these findings have since been heavily debated, however it has become more widely accepted that the obese microbiome is endowed with a greater dietary energy harvesting capacity. Indeed, higher levels short chain fatty acids (SCFA) arising from microbial fermentation of dietary starch and carbohydrate have been measured in fecal samples of obese versus normal-weight subjects. Increased dietary energy harvesting by the commensal flora resulting in increased SCFA production could provide the host with additional energy sources leading to altered host metabolic processes regulating the production and storage of fatty acids and cholesterol.

Changes in dietary behavior represent a compounding factor in the relationship between the gut microbiota and obesity. Western diets are characterized by high fat, sugar and refined carbohydrate intakes and reduced amounts of complex plant polysaccharides and starches. Analysis of published dietary records indicated significant dietary intake differences between obese and normal-weight children, particularly in the quantities of dietary fructose which were twice the amount in obese children. Despite an abundance of studies analyzing the impact of Western dietary modulation on either the host or microbiota, comparably few studies have examined this effect in children. The aim of this doctoral dissertation was to develop a systems biology platform using “omics”-driven technologies and a combination of *in vitro* and *in vivo* models to assess the impact of dietary modulation on the gut microbiota of obese and normal-weight children. The major hallmark of this body work lies in the

Summary

evolving degree of complexity of each study by advancing results obtained from each individual component through development of complimentary but improved methodology.

The first component involved a clinical study in collaboration with the Kinderspital St. Gallen and analyzed both the composition (qPCR) and metabolic products (HPLC) of gut microbiota in fecal samples obtained from obese and normal-weight children. Results indicated no significant differences in the microbial composition between the two groups of children. Higher amounts of the SCFA butyrate and propionate were however, detected in fecal water of obese children. Higher residual amounts of intermediate metabolites such as lactate were conversely observed in normal-weight but not obese feces suggesting exhaustive substrate utilization by obese microbiota. These results concurred with the observation of higher metabolic activity in the obese microbiome but could not demonstrate a link between the *Firmicutes* : *Bacteroidetes* ratio and obesity. During the second component of my systems biology approach, a three-stage continuous *in vitro* gut fermentation model was developed to assess the impact of Western dietary trends on the gut microbiota. The principle advantage of using three-stage *in vitro* gut fermentation models is their design closely mimics the colonic physiology of the proximal (pH 5.5), transverse (6.2) and distal (6.8) large intestinal regions, facilitating the maintenance of pseudo steady-state intestinal conditions for experimentation. Two separate models were inoculated with immobilized feces obtained from either an obese or normal-weight child and operated for 42 days. Dietary modulation was achieved by sequentially supplying three different fermentation media to the model during separate fermentation periods. The fermentation media were carefully design based upon published dietary records of dietary habits of obese (HE), normal-weight (NE) and anorectic (LE) children. HE fermentation medium produced a butyrogenic effect on both microbiota while inducing a subtle dysbiosis within butyrate-producing members of *Clostridium* cluster XVIa. Stimulation of lactate-utilizing, butyrate-producing *E. hallii* was observed in obese microbiota whereas acetate-utilizing, butyrate-producing *Roseburia* / *E. rectale* was observed in the normal-weight model. The opposite effect on *E. hallii* and *Roseburia* / *E. rectale* was observed during NE fermentation. LE fermentation produced a highly similar and concerted compositional and metabolic effect on both microbiota.

A major criticism of *in vitro* gut fermentation models relates to the absence of host parameters within the model design. In order to investigate the impact of dietary modulation on host functionality, a combined *in vitro* gut-cell model comprised of confluent, mucus-secreting HT29-MTX epithelial cells

Summary

was developed. Microbe-laden and wells as microbe-free fermentation effluents from the proximal (R1) and distal colon (R3) reactors of each fermentation model obtained during HE, NE and LE fermentation periods were applied directly to HT29-MTX cells to assess immunoreactivity as well as epithelial barrier integrity in response to dietary modulation. Immunoreactivity was assessed by measuring cytokine secretion by HT29-MTX cells and the epithelial barrier integrity was monitored by changes to the transepithelial electrical resistance (TER). Dietary modulation produced a negligible impact on cytokine production but was a main determinant in altered epithelial integrity. High butyrate concentrations present in HE fermentation effluents as well as LE effluents significantly enhanced epithelial barrier integrity. Cytokine production however, was distinctly different between the two microbiota with IL-1Ra secretion in the obese and IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 secretion in the normal-weight model. These observed differences may be attributed to differences in the community compositions between the obese and normal-weight microflora, suggested by the absence of *Lactobacillus* in obese microbiota but constant in normal-weight flora.

The final and most complex component of my systems biology platform involved an *in vivo* animal study to simultaneously assess the impact of dietary fructose consumption on both the host and gut microbiota. Twenty male Fisher rats were divided into two groups and conventionalized with either obese or normal-weight microbiota. Each microbiota weight status group was then either provided dietary fructose or served as controls. Fructose consumption was associated with higher weight gain and body fat percentages, particularly in normal-weight conventionalized animals. Both leptin and adiponectin were also significantly elevated in the sera of fructose-fed animals. Obese conventionalized animals harbored significantly higher levels of CRP suggesting potential development of obesity-associated metainflammation. Dysbiosis in the butyrate-producing community was again observed, marked by stimulation of lactate-utilizing *E. hallii* and a small but significant reduction in acetate-utilizing *Roseburia* / *E. rectale* and *F. prausnitzii* in fructose-fed obese and normal-weight conventionalized animals. Furthermore, potential establishment of a lactate-dependent cross-feeding niche between lactate-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* and other lactate-utilizing species belonging to *Veillonella* and sulfate-reducing bacteria (SRB) was observed. Results from this study indicate a possible substrate conditioning mechanism initiated by diet-induced dybiosis and increased metabolic activity, leading to evolution of an obese microbiome with the potential for altered host-microbe interactions and microbial-mediated changes in host metabolism. The degree of dybiosis may taper once the microbiota become effectively substrate conditioned, resulting in proliferation of a

Summary

Western-diet microbiome equipped with genes efficient in energy harvesting and potentially composed of lactate cross-feeding niches. Perturbed host-microbe interactions may ensue, contributing to temporal development of metabolic disease.

In summary, this doctoral dissertation describes the use of a systems biology platform designed to assess the impact of dietary modulation on the gut microbiota of obese and normal-weight children. High energy loads such as those consumed by obese children and fructose consumption in particular appear capable of inducing dysbiosis in the butyrate-producing gut microbial community as this effect was observed both *in vitro* and *in vivo*. Adaptation of the microbiota to altered dietary behavior appears to ensue rapidly but with an eventual attenuation of this response, a possible function of acquisition of a “new” microbiome with implications for impacting host-microbe interactions and host metabolism. The complimentary results obtained through use of various components of this systems biology platform and different “omics”-driven technologies suggest this type of model-driven experimentation is a valuable tool for future studies dissecting the relationship of the gut microbiota and obesity.