



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Μετα-πρωτεωμική μελέτη μεταβολών του εντερικού  
μικροβιώματος και του πρωτεώματος ξενιστή σε  
μοντέλο φλεγμονής επαγόμενης από *Citrobacter  
rodentium***

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Γ. ΖΗΡΟΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018**

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μετα-πρωτεωμική μελέτη μεταβολών του εντερικού μικροβιώματος και του πρωτεώματος ξενιστή σε μοντέλο φλεγμονής επαγόμενης από *Citrobacter rodentium*

### ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Γ. ΖΗΡΟΣ

A.M.: 71601

### ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

### ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, Ερευνητής Α', Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΥΡΥΚΛΕΙΑ ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.



ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, Ερευνητής Α', Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»



ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΩΜΑΪΔΗΣ, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 9-10-2018

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετα-πρωτεωμική είναι μια αναδυόμενη μεθοδολογία στην έρευνα του μικροβιώματος. Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε το εντερικό μικροβίωμα ποντικού, μολυσμένου από το παθογόνο βακτήριο *Citrobacter rodentium*, ως μοντέλο συστήματος. Το εξεταζόμενο πρωτόκολλο εξαγωγής επέτρεψε την απομόνωση πρωτεϊνών ξενιστή και μικροβίων ταυτόχρονα. Τα προϊόντα της λύσης πρωτεϊνών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία που περιελάμβανε θρυψινική πέψη με δύο διαφορετικά πρωτόκολλα προετοιμασίας δείγματος (FASP ή/και SP3) παράγοντας θρυπτικά πεπτίδια που αναλύθηκαν με nanoUHPLC-MS/MS.

Η πολυπλοκότητα του εντερικού μικροβιώματος απαιτούσε μια ισχυρή βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιώντας τόσο την UniProtKB όσο και μια βάση δεδομένων που είχε δημιουργηθεί από την μετα-γονιδιωματική ανάλυση 184 ποντικών. Η στρατηγική που αναπτύχθηκε ήταν μια αναζήτηση πρωτεϊνών δύο σταδίων χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GalaxyP με το λογισμικό !XTandem, ακολουθούμενο από δύο άξονες ανάλυσης, MaxQuant - Perseus και Proteome Discoverer - Unipept. Το πρώτο βήμα ήταν απαραίτητο για τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων που περιέχει μόνο πρωτεΐνες που υπάρχουν στο δείγμα. Στο δεύτερο βήμα, δημιουργήθηκαν ποσοτικά πρωτεϊνικά δεδομένα είτε με ποσοτικοποίηση χωρίς σήμανση στην περίπτωση του MaxQuant, όπου ακολουθούσε στατιστική επεξεργασία με Perseus, είτε με αναζήτηση με τη χρήση του “target-decoy” αλγορίθμου στην περίπτωση του Proteome Discoverer, όπου ακολουθούσε ταξονομική κατανομή των ταυτοποιημένων μικροβιακών πεπτιδίων με Unipept, το οποίο αναζητούσε τον χαμηλότερο κοινό πρόγονο (LCA). Τα αποτελέσματα θα παρουσιαστούν σε μεταβολές εντερικού μικροβιώματος και πρωτεώματος ξενιστή σε δείγματα κοπράνων ποντικών, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Πρωτεϊνική Χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** εντερικό μικροβίωμα, πρωτεωμική/μετα-πρωτεωμική ανάλυση, υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης, φασματομετρία μάζας, βιοπληροφορική

## ABSTRACT

Metaproteomics is an emerging methodology in microbiome research. In this thesis, the mouse intestinal microbiome, infected by the pathogenic bacterium *Citrobacter rodentium*, was used as a system model. The tested extraction protocol allowed the isolation of host and microbial proteomes simultaneously. Protein lysates were processed by two different single-vessel sample preparation protocols (FASP and / or SP3), which included trypsin digestion, producing tryptic peptides that were analyzed by using nanoUHPLC-MS / MS.

Gut microbiome complexity required a robust bioinformatics analysis using both UniprotKB and a database generated by metagenomic analysis of 184 mice. The strategy developed was a two-step protein search using the GalaxyP framework with the !XTandem software, followed by two analysis workflows, MaxQuant - Perseus and Proteome Discoverer - Unipept. The first step was necessary to create a sub-database containing only proteins present in the sample. In the second step, quantitative proteomic data was generated through either label-free quantification in the case of MaxQuant, followed by statistical processing with Perseus, or searching by using the “target-decoy” algorithm in the case of Proteome Discoverer, followed by a taxonomic allocation of identified microbial peptides using Unipept, which was searching for the lowest common ancestor (LCA). The results will be presented on microbiome and host proteome alterations in mouse fecal samples, at different time points.

**SUBJECT AREA:** Protein Chemistry

**KEYWORDS:** intestinal/gut microbiome, proteomics/Metaproteomics, ultra-high performance liquid chromatography, mass spectrometry, bioinformatics

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντές μου, Δρ. Ευρύκλεια Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. και Δρ. Γεώργιο Παναγιώτου, Ερευνητή Α' του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή στην ολοκλήρωσή της. Τη Δρ. Ε. Λιανίδου με το να με δεχθεί στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία μεταλαμπαδεύοντας μου γνώσεις καθόλη την διάρκεια των δύο αυτών χρόνων και τον Δρ. Γ. Παναγιώτου που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με στήριξε σε όλες τις δύσκολες στιγμές, συμβάλλοντας τα μέγιστα στη διαμόρφωσή μου από πλήρως μαθητευόμενο σε εν δυνάμει αυτόνομο ερευνητή. Παράλληλα, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω ειδική μνεία στην Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη, Ε.Λ.Ε. του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγηση που μου προσέφερε τον δημιουργικό αυτό χρόνο στο εργαστήριο, καθώς η συνεισφορά της αποτέλεσε το συνεκτικό κρίκο για την κατανόηση των διαφόρων πτυχών της εργασίας μου. Μου μετέδωσε πληθώρα εφοδίων, τα οποία θεωρώ ότι θα μου φανούν ιδιαίτερος χρήσιμα στη συνέχιση των ερευνητικών σπουδών μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου και ιδιαίτερα τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Γεώργιο Σταματάκη, του οποίου η συμβολή ήταν καθοριστική στην ολοκλήρωση των πειραμάτων καθώς και την Δρ. Μαρίνα Κοτσίκη, η οποία με βοήθησε στα πρώτα μου βήματα μέσα στο εργαστήριο. Στα πλαίσια αυτά θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και το Δρ. Δημήτριο Κοντογιάννη, Ερευνητή Α' του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» καθώς και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Φώτη Ιωακείμιδη, οι οποίοι αποτέλεσαν θεμέλιο λίθο στην πραγματοποίηση αυτής της ερευνητικής εργασίας καθώς μας παρείχαν τα απαραίτητα δείγματα και την κατάλληλη υποστήριξη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δρ. Γ. Α. Παυλόπουλο, βασικό ερευνητή και επικεφαλή της βιοπληροφορικής (Β' βαθμός – Αναπληρωτής Καθηγητής) του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» για την πολύτιμη προσφορά του.

## **ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ**

Αφιερώνω αυτή την εργασία στην οικογένειά μου, στους φίλους μου, σε όσους με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια αυτού του δύσκολου εγχειρήματος και ειδικότερα στον πατέρα μου Γεώργιο Ζήρο.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>1</b>
<b>1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ</b> .....	<b>2</b>
1.1 Γενικές πληροφορίες για εντερικό μικροβίωμα.....	2
1.1.1 Αμοιβαία επωφελής συνεξέλιξη.....	2
1.1.2 Το μικροβίωμα ως «ανθρώπινο όργανο» και αριθμητικά δεδομένα 3	
1.2 Το εντερικό μικροβίωμα ως εξελικτικό εργαλείο .....	4
1.3 Λειτουργίες εντερικού μικροβιώματος .....	4
1.3.1 Μεταβολισμός .....	5
1.3.2 Αμυντικό σύστημα .....	5
1.3.3 Εντερικο-εγκεφαλικός άξονας.....	6
1.4 Εμπλοκή του εντερικού μικροβιώματος σε παθογενετικούς μηχανισμούς νόσων .....	7
1.4.1 Απώλεια βακτηριακής ποικιλότητας .....	7
1.4.2 Δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο του εντερικού μικροβιώματος στην φλεγμονώδη νόσο εντέρου (IBD).....	8
1.5 Ασθένειες και εντερικό μικροβίωμα .....	8
1.5.1 Συστηματικές μεταβολικές νόσοι .....	8
1.5.2 Αθηρωμάτωση .....	9
1.5.3 Αλλεργικές αντιδράσεις .....	9
1.5.4 Καρκίνος.....	10
<b>2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ</b> .....	<b>12</b>
2.1 Μοριακές τεχνικές .....	12
2.2 “Culturomics” - Αναγέννηση καλλιεργειών και μελέτη εντερικού μικροβιώματος.....	12
2.2.1 Η MALDI-TOF/MS στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών .....	13

2.3	Αναλύσεις “META-MULTI-OMICS” στο εντερικό μικροβίωμα .....	15
2.3.1	Μετα-γονιδιωματική.....	15
2.3.2	Μετα-μεταγραφωματική.....	16
2.3.3	Μετα-πρωτεωμική .....	17
<b>3</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ</b>	
	<b>21</b>	
3.1	Το <i>Citrobacter rodentium</i> ως μοντέλο μελέτης εντερικής βακτηριακής λοίμωξης στα ποντίκια.....	21
3.2	Κυτταροειδική Γονιδιακή Στόχευση (gene targeting) – Σύστημα Cre-LoxP	22
3.3	Πρωτεΐνη HuR και ανοσολογική απάντηση.....	23
<b>4</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ /</b>	
	<b>ΜΕΤΑ-ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ .....</b>	<b>25</b>
4.1	Δειγματοληψία .....	25
4.2	Αποθήκευση – συντήρηση κοπράνων .....	25
4.2.1	Χρήση κρυο-προστατευτικών ουσιών .....	26
4.3	Προ-επεξεργασία δείγματος (pre-processing of the sample) .....	26
4.4	Απομόνωση πρωτεϊνών (protein extraction).....	28
4.5	Πέψη πρωτεϊνών.....	30
4.5.1	Συγκριτική αξιολόγηση διαφόρων μεθοδολογιών πέψης πρωτεϊνών .....	32
4.6	Εφαρμογές τεχνικών προετοιμασίας δείγματος κοπράνων για μετα-πρωτεωμική ανάλυση φασματομετρίας μάζας .....	33
4.7	Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης / Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) .....	34
4.7.1	Διασύνδεση συστημάτων υγρής χρωματογραφίας με φασματόμετρο μαζών .....	35
4.8	Φασματομετρία μάζας πρωτεϊνών .....	36



4.8.1	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό / Electro-Spray Ionization (ESI)	36
4.8.2	Αναλυτές μαζών .....	37
4.8.3	Πρόσθετες μονάδες διατάξεων φασματομέτρων μαζών.....	38
4.9	Υβριδικός αναλυτής Orbitrap .....	38
<b>5</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ.....</b>	<b>40</b>
5.1	Πληροφοριακά εργαλεία για ποιοτική και ποσοτική επεξεργασία πρωτεϊνικών δεδομένων LC-MS από δείγματα με μεθόδους δίχως σήμανση	40
5.1.1	Συστηματικά σφάλματα .....	40
5.1.2	Ελλείπουσες τιμές (missing values) .....	45
5.2	Εργαλεία για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων στην LC-MS με προσανατολισμό την πρωτεωμική / μετα-πρωτεωμική .....	46
5.3	Επαγγελματικά Λογισμικά για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών χωρίς σήμανση σε πρωτεωμική / μετα-πρωτεωμική ανάλυση με MS.....	47
	<b>Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup> ΜΕΘΟΔΟΙ &amp; ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>51</b>
6.1	Δείγματα κοπράνων από διαγονιδιακά ποντίκια .....	51
6.2	Πρωτόκολλο επεξεργασίας δειγμάτων .....	51
6.2.1	Πέψη πρωτεϊνών .....	52
6.3	Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (nanoUHPLC-MS/MS) .....	54
6.4	Πρωτόκολλα επεξεργασίας δεδομένων δειγμάτων κοπράνων .....	55
6.4.1	Ανάλυση MaxQuant .....	55
6.4.2	Ανάλυση δύο βημάτων – Galaxy .....	55
6.4.3	Στατιστική ανάλυση – Perseus .....	56
6.4.4	Βιοπληροφορικά προγράμματα Panther και DAVID.....	57
6.4.5	Proteome Discoverer.....	59

6.4.6	Unipept.....	59
6.5	Πρωτόκολλο επεξεργασίας στερεής καλλιέργειας <i>Citrobacter rodentium</i> .....	60
6.5.1	SDS-PAGE electrophoresis .....	60
6.5.2	Χρώση με "Blue Silver" Coomassie Colloidal Blue .....	61
6.5.3	Χρώση Νιτρικού Αργύρου (Silver nitrate staining protocol) .....	62
6.6	Πέψη και UHPLC-MS/MS στα δείγματα <i>C. rodentium</i> .....	63
6.7	Πρωτόκολλο επεξεργασίας δεδομένων δείγματος βακτηριακής καλλιέργειας <i>C. rodentium</i> .....	63
<b>7</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup> ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>65</b>
7.1	Μελέτη πρωτεώματος του ξενιστή/ποντικού στην εντερική φλεγμονή συναρτήσει της έκφρασης της πρωτεΐνης HuR.....	65
7.1.1	Διαγονιδιακά ποντίκια.....	65
7.1.2	Μολύνσεις ποντικών με το βακτήριο <i>Citrobacter rodentium</i> .....	66
7.1.3	Ανάλυση πρωτεώματος ξενιστή/ποντικού (host proteome analysis).....	67
7.2	Μετα-πρωτεωμική ανάλυση .....	102
7.3	Πρωτεωμική ανάλυση του βακτηρίου <i>Citrobacter rodentium</i> .....	108
<b>8</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup> ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>112</b>
8.1	Πρωτεΐνες ξενιστή.....	112
8.1.1	GDP-mannose-4, 6-dehydratase.....	112
8.1.2	Κυσταθειονάση (κυσταθειονίνη-γ-λυάση / cystathionine-gammapyase, cystathionase/ Cth or Cse) .....	113
8.1.3	Καρβοξυλοεστεράσες: Carboxylesterase-1C (Ces1c) και Carboxylesterase-2C (Ces2c).....	113
8.1.4	Colipase (Clps).....	114
8.1.5	Κρεατινική Κινάση τύπου U, μιτοχονδριακή (Creatine kinase U type, mitochondrial – Ckmt1) .....	114

8.2	Μεταβολές στα βακτηριακά φύλα του εντερικού μικροβιώματος.....	115
8.3	Αντιπροσωπευτικότητα και αναπαραγωγιμότητα.....	116
8.4	Επίλογος – Συμπεράσματα.....	117

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 7.1:** Δείγματα κοπράνων που συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν από κάθε ομάδα (σετ) πειραμάτων και οι χρονικές στιγμές (ημέρες)

**Πίνακας 7.2:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όπως παρέχονται από την ανάλυση Perseus και τις απεικονίσεις των θερμικών χαρτών, που αφορούν στους μέσους όρους των βιολογικών επαναλήψεων (heat maps of average groups), όπου καταγράφονται οι πρωτεΐνες/γονίδια με τη μεγαλύτερη ένταση, δηλαδή οι πιο υπερ-εκφρασμένες ↑ , καθώς και αυτές με τη χαμηλότερη ένταση, δηλαδή οι πιο υπο-εκφρασμένες ↓.

**Πίνακας 7.3:** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων/πρωτεϊνών, που λήφθηκαν από την ανάλυση της 10<sup>ης</sup> συστοιχίας μήτρας του 1<sup>ου</sup> πειράματος (1<sup>st</sup> exp matrix10) έναντι βάσης δεδομένων υποβάθρου *mus musculus*, με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής Panther.

**Πίνακας 7.4:** Καταγραφή των γονιδίων / πρωτεϊνών που ανήκουν στη Βιολογική Διαδικασία “immune system process” του Πίνακα 7.3, όπως εξήχθη από τη βιοπληροφορική εφαρμογή Panther.

**Πίνακας 7.5:** Ταξινόμηση των γονιδίων / πρωτεϊνών, που ελήφθησαν από την ενισχυμένη / εμπλουτισμένη ανάλυση (enriched analysis), της συνδυασμένης λίστας από τις συστοιχίες μήτρας 26, 27 και 28 του 1<sup>ου</sup> πειράματος (1<sup>st</sup> exp matrix26,27,28; Perseus) έναντι της 1<sup>st</sup> exp matrix10 ως υποβάθρου (background), με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής DAVID.

**Πίνακας 7.6:** Καταγραφή των γονιδίων/πρωτεϊνών που ανήκουν στην Βιολογική Διαδικασία :immune system process” του Πίνακα 7.5, όπως εξήχθη από τη βιοπληροφορική εφαρμογή DAVID.

**Πίνακας 7.7:** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων/πρωτεϊνών που ελήφθησαν από την ανάλυση της 11<sup>ης</sup> συστοιχίας μήτρας του 3<sup>ου</sup> πειράματος (3<sup>rd</sup> exp matrix11) έναντι βάσης δεδομένων υποβάθρου *mus musculus*, με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής Panther.

**Πίνακας 7.8:** Καταγραφή των γονιδίων/πρωτεϊνών που ανήκουν στη Βιολογική Διαδικασία “immune system process” του Πίνακα 7.7 όπως εξήχθη από τη βιοπληροφορική εφαρμογή Panther.

**Πίνακας 7.9:** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων / πρωτεϊνών που ελήφθησαν από την ενισχυμένη / εμπλουτισμένη ανάλυση (enriched analysis) της συνδυασμένης λίστας από τις συστοιχίες μήτρας 68, 70 και 72 του 3<sup>ου</sup> πειράματος (3<sup>rd</sup> exp matrix68,70,72) έναντι της 3<sup>rd</sup> exp matrix11 ως υποβάθρου (background), με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής DAVID.

**Πίνακας 7.10:** Ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα), *Proteobacteria* (πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> ομάδας πειραμάτων την ημέρα μηδέν (0).

**Πίνακας 7.11:** Μέσος όρος και τυπικές αποκλίσεις των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα), *Proteobacteria* (πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> ομάδας πειραμάτων την ημέρα μηδέν (0).

**Πίνακας 7.12:** Ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα), *Proteobacteria* (πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> ομάδας πειραμάτων την 10<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα.

**Πίνακας 7.13:** Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα), *Proteobacteria* (πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> ομάδας πειραμάτων την 10<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 2.1:** Απεικόνιση των τριών κυρίαρχων μετα-ωμικών προσεγγίσεων (Ilhan, Z.E. 2016. *Microbiome After Bariatric Surgery and Microbial Insights into Surgical Weight Loss. Ph. D. Disertation, Arizona State University. August 2016.*)

**Εικόνα 7.1.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.1, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρανά ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.

**Εικόνα 7.1.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.1, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, Tg- και Tg+ (1<sup>st</sup> exp, day 10, Tg- vs Tg+).

**Εικόνα 7.2.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.2, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρανά ποντικών με γονότυπο/ομάδα M-HuRko και Control.

**Εικόνα 7.2.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.2, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, M-HuRko και Control (1<sup>st</sup> exp, day 10, M-HuRko vs Control).

**Εικόνα 7.3.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.3, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρανά ποντικών με γονότυπους IEC-HuRko και Control.

**Εικόνα 7.3.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.3, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, IEC-HuRko και Control (1<sup>st</sup> exp, day 10, IEC-HuRko vs Control).

**Εικόνα 7.4.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.4, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρανά ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.

**Εικόνα 7.4.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.4, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών

επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, Tg- και Tg+ (3<sup>rd</sup> exp, day 9, Tg- vs Tg+).

**Εικόνα 7.5.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.5, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους M-HuRko και Control.

**Εικόνα 7.5.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.5, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, M-HuRko και Control (3<sup>rd</sup> exp, day 9, M-HuRko vs Control).

**Εικόνα 7.6.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.6, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους/ομάδα IEC-HuRko και Control.

**Εικόνα 7.6.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.6, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, IEC-HuRko και Control (3<sup>rd</sup> exp, day 9, IEC-HuRko vs Control).

**Εικόνα 7.7.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.7, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg-, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Εικόνα 7.7.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.7, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, Tg- , σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, Tg- day0 vs Tg- day9)

**Εικόνα 7.8.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.8, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg+, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Εικόνα 7.8.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.8, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, Tg+ , σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, Tg+ day0 vs Tg+ day9).

**Εικόνα 7.9.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.9, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανά ποντικών με τον ίδιο γονότυπο/ομάδα, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Εικόνα 7.9.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.9, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, Control day0 vs Control day9).

**Εικόνα 7.10.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.11, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανά ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Εικόνα 7.10.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.11, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, M-HuRko day0 vs M-HuRko day9).

**Εικόνα 7.11.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.13, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανά ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, IEC-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Εικόνα 7.11.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.13, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, IEC-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, IEC-HuRko day0 vs IEC-HuRko day9).

**Εικόνα 7.12 :** **Αριστερά :** Χρώση “Blue Silver” Coomassie Colloidal Blue στο SDS-PAGE ηλεκτροφόρημα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της στερεής καλλιέργειας *C.rodentium*. **Δεξιά :** Χρώση Νιτρικού Αργύρου (Silver nitrate) στο SDS-PAGE ηλεκτροφόρημα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της στερεής καλλιέργειας *C.rodentium*.



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ-ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

**Σχήμα 4.1:** Απεικόνιση του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (*Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. International Journal of Analytical Chemistry, 2012, 1–40*)

**Σχήμα 4.2:** Απεικόνιση του υβριδικού αναλυτή Orbitrap (*LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific*)

**Σχήμα 6.1:** Αναπαράσταση της διαδικασίας FASP (*Τροποποιημένο από Erde, J., Loo, R. R. O., & Loo, J. A. (2014). Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. Journal of Proteome Research, 13(4), 1885–1895*)

**Σχήμα 6.2:** Αναπαράσταση της διαδικασίας SP3 (*SP3 - ultrasensitive, rapid, unbiased and efficient protein purification suitable for automation EMBLEM Ref. 2014-006, INNOVATION WORKS™ Technology from the European Molecular Biology Laboratory, Dr. Jeroes Krijgsveld, Dr. Lars Steinmetz & Dr. Christopher Hughes*)

**Σχήμα 7.1:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.

**Σχήμα 7.2:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και M-HuRko.

**Σχήμα 7.3:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και IEC-HuRko.

**Σχήμα 7.4:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.

**Σχήμα 7.5:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και M-HuRko.

**Σχήμα 7.6:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και IEC-HuRko.

**Σχήμα 7.7:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg-, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Σχήμα 7.8:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg+, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Σχήμα 7.9:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Σχήμα 7.10:** Διάγραμμα Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9). Με τις καμπύλες διαχωρίζονται οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες/γονίδια με τιμές κατωφλίων  $FDR \leq 0.05$ ,  $\log_{10}FC \leq -0.38$  ή  $\log_{10}FC \geq +0.35$ , και  $-\text{Log}p \geq 1.33$

**Σχήμα 7.11:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Σχήμα 7.12:** Διάγραμμα Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9). Με τις καμπύλες διαχωρίζονται οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες/γονίδια με τιμές κατωφλίων  $FDR \leq 0.05$ ,  $\log_{10}FC \leq -0.34$  ή  $\log_{10}FC \geq +0.46$  και  $-\text{Log} p > 1.55$ .

**Σχήμα 7.13:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, IEC-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

**Γράφημα 7.1:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.3

**Γράφημα 7.2:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.5

**Γράφημα 7.3:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.7

**Γράφημα 7.4:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.9

**Γράφημα 7.5:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται τα ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα)

, *Proteobacteria* πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την ημέρα μηδέν (0)

**Γράφημα 7.6:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται οι μέσοι όροι των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την ημέρα μηδέν (0)

**Γράφημα 7.7:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται τα ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την 10η και 9η ημέρα, αντίστοιχα

**Γράφημα 7.8:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται οι μέσοι όροι των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την 10η και 9η ημέρα, αντίστοιχα

**Γράφημα 7.9:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε KEGG pathways του πρωτεόματος του *C.rodentium*.

**Γράφημα 7.10:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε GOCC του πρωτεόματος του *Citrobacter rodentium*

**Γράφημα 7.11:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε GOBP του πρωτεόματος του *C.rodentium*

**Γράφημα 7.12:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε GOMF του πρωτεόματος *C.rodentium*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία μου εκπονήθηκε από τον Οκτώβριο του 2017 έως και τον Σεπτέμβριο του 2018 στο τμήμα Μοριακής Ογκολογίας του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», στο εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του Ερευνητή Α' Δρ. Γεωργίου Παναγιώτου, σε συνεργασία με το εργαστήριο του Ερευνητή Α' Δρ. Δημητρίου Κοντογιάννη, του τμήματος Ανοσολογίας του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Χημείας», Ειδίκευση «Κλινική Χημεία», του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., με υπεύθυνη την Καθηγήτρια Δρ. Ευρύκλεια Λιανίδου.

# 1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

## 1.1 Γενικές πληροφορίες για εντερικό μικροβίωμα

Οι ιατρικές διαπιστώσεις του Ιπποκράτη αποδεικνύονται διαχρονικά ορθές (περισσότερο από 2.000 χρόνια μετά). Η ρήση του, ότι «όλες οι ασθένειες ξεκινούν από το έντερο» επιβεβαιώνεται πανηγυρικά στην εποχή μας.<sup>(1)</sup>

Αρχαία, ιοί, βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα συναποτελούν αυτό που αποκαλείται μικροβίωμα και σε αφθονία αποικίζουν διάφορες θέσεις στο ανθρώπινο σώμα. Ο σωλήνας του γαστρεντερικού από τη στοματική κοιλότητα έως τον πρωκτό φιλοξενεί το σημαντικότερο, τουλάχιστον αριθμητικά, τμήμα του ανθρώπινου μικροβιώματος. Τα βακτήρια κυριαρχούν στο εντερικό μικροβίωμα αριθμητικά. Ταυτόχρονα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στη διατήρηση διά βίου της υγείας (διατροφική ισορροπία – ανοσολογική επάρκεια), όσο και στην πυροδότηση πολύπλοκων παθογενετικών μηχανισμών σε ένα φάσμα ασθενειών.<sup>(2)</sup>

### 1.1.1 Αμοιβαία επωφελής συνεξέλιξη

#### Συνεξέλιξη

Η εξελικτική διαδικασία του ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος όπως και η αντίστοιχη του *Homo Sapiens* επηρεάστηκαν καθοριστικά από την δομή του διαιτολογίου και του τρόπου ζωής των ανθρώπινων πληθυσμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της συνεξέλιξης μικροβιώματος-ανθρώπου είναι το *Helicobacter pylori*. Η παγκόσμια διασπορά των στελεχών του μικροβίου ιχνηλατεί τις μετακινήσεις των πληθυσμών του *Homo Sapiens* εκτός Αφρικής.<sup>(3,4)</sup>

#### Απειλή και πρόκληση

Η ύπαρξη του εντερικού μικροβιώματος αποτελεί μία συνεχή απειλή για εκδήλωση λοίμωξης στον άνθρωπο. Ταυτόχρονα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για ανάπτυξη επαρκούς αμυντικού συστήματος.<sup>(5)</sup>

#### Αμοιβαίο όφελος για τα θηλαστικά<sup>(6)</sup>

- I. Προστατευτικές Λειτουργίες :
  - a) Ανταγωνίζονται τα παθογόνα ως προς τη σύνδεση με εντερικούς υποδοχείς ή και θρεπτικές ουσίες
  - b) Παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων
- II. Ευνοϊκές Δομικές Λειτουργίες :
  - a) Ανάπτυξη Ανοσολογικού Συστήματος

b) Επαγωγή παραγωγής ανοσοσφαιρίνης IgA

c) Ενδυνάμωση των επιθηλιακών φραγμών

III. Μεταβολικές Λειτουργίες :

a) Έλεγχος διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων

b) Σύνθεση βιταμινών-αμινοξέων

c) Βιομετατροπές χολής, ξενοβιοτικών-καρκινογόνων

d) Εξοικονόμηση ενέργειας (παραγωγή **λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου SCFAs**)

e) Μεταβολισμός άπεπτων υδατανθράκων (μετατροπή γλυκανών με γλυκοσιροϋδροξυλάση σε πεπτά σάκχαρα)

f) Απορρόφηση ιόντων-ιχνοστοιχείων

**Αμοιβαίο όφελος για τα συμβιωτικά μικρόβια:**

I. Περιβάλλον ανάπτυξης

II. Ενεργειακής Επάρκειας

**1.1.2 Το μικροβίωμα ως «ανθρώπινο όργανο» και αριθμητικά δεδομένα**

➤ Ζυγίζει περίπου 1kg

➤ Οργάνωση κυττάρων για συνεργασία με ανοσολογικό σύστημα πιο αποτελεσματική από αυτήν του ήπατος.

➤ Πολυοργανική συνεργασία τόσο με γεινιάζοντα όσο και με απομακρυσμένα όργανα

➤ Καθοριστικός ρόλος στη διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή προσφέροντας βιοσυνθετικές οδούς απολύτως απαραίτητες για αυτόν.<sup>(7)</sup>

1. Ο αριθμός των κυττάρων εντερικού μικροβιώματος είναι δεκαπλάσιος των κυττάρων του ξενιστή. Απόλυτος αριθμός που προσεγγίζει τα 100 τρισεκατομμύρια μικρόβια.

2. Ο αριθμός των γονιδίων του εντερικού μικροβιώματος είναι εκατονταπλάσιος των γονιδίων του ξενιστή (περίπου 23.000 γονίδια) π.χ. το ανθρώπινο γονιδίωμα δεν διαθέτει γονίδια για πέψη γλυκανών.

3. Τα αποκλειστικά αναερόβια μικρόβια του εντερικού μικροβιώματος είναι εκατονταπλάσια των αεροβίων και των προαιρετικά αναερόβιων μικροβίων.

4. Περισσότερο από πενήντα βακτηριακά φύλα έχουν ανιχνευθεί στο ανθρώπινο έντερο. Αριθμητικά, όμως, κυριαρχούν σε ποσοστό 90% δύο φύλα, τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*. Δύο άλλα, τα *Proteobacteria* και τα *Actinomycetes* υπάρχουν σταθερά, αλλά σαφώς ολιγάριθμα.

5. Περισσότερα από 1000 είδη αποικίζουν το ανθρώπινο έντερο.

6. Η κατανομή των βακτηριακών φορτίων διαφέρει σημαντικά από

ανατομική θέση σε ανατομική θέση του εντέρου. Αναφέρονται  $10-10^3$  βακτήρια ανά γραμμάριο στομαχικού-δωδεκαδακτυλικού περιεχομένου. Καταγράφονται υψηλότερα βακτηριακά φορτία της τάξης των  $10^4-10^7$  βακτηρίων ανά γραμμάριο περιεχομένου λεπτού εντέρου. Οι τιμές αυτές εκτινάσσονται στα  $10^{11}-10^{12}$  βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου παχέος εντέρου.

7. Η μικροβιακή σύνθεση των κοπράνων κυριαρχείται από τα είδη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Runinococcus*. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, αρκετά από αυτά ΔΕΝ είναι ενεργά, π.χ. τα *Bacteroides*, στην πλειονότητά τους, βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση. Αντίθετα στη βλεννώδη στοιβάδα του λεπτού και τις αντίστοιχες εντερικές κρύπττες βρίσκουμε μόνο *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Enterococcus*. Ακόμη και μεταξύ των ανατομικών θέσεων, για παράδειγμα, του παχέος εντέρου εμφανίζεται σημαντική μικροβιακή ετερογένεια. Η αντίληψη της ύπαρξης διαφορετικών μικρο-περιβάλλοντων κατά μήκος ολόκληρου του εντερικού σωλήνα φαίνεται να ερμηνεύει ακριβέστερα τις λειτουργίες του εντερικού μικροβιώματος.

## 1.2 Το εντερικό μικροβίωμα ως εξελικτικό εργαλείο

Ο Δαρβίνος ερμηνεύει τη ζωή ως αγώνα των οργανισμών να μοιραστούν περιορισμένους πόρους. Οργανισμοί αρτιότερα προσαρμοσμένοι στο περιβάλλον τους επικρατούν. Το εντερικό μικροβίωμα, τουλάχιστον, στα σπονδυλωτά εμφανίζεται σε πρόσφατες έρευνες να διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην διαδικασία επιτυχήστερης προσαρμογής. Αναδεικνύεται, λοιπόν, ότι για την επιτυχή επιβίωση δεν αρκεί μόνο ο αγώνας, αλλά και η αναγκαιότητα συνεργασίας προκύπτει εξίσου ζωτική.<sup>(4)</sup>

Οι εξελικτικοί βιολόγοι προσπαθούν να ερμηνεύσουν τους υποκείμενους μηχανισμούς αυτής της επίδρασης συνδέοντας την ταξονομική ποικιλότητα του εντερικού μικροβιώματος στα σπονδυλωτά με την εξελικτική τους ιστορία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η, εξαρτώμενη από το εντερικό μικροβίωμα, παραγωγή απαραίτητων βιταμινών που «χαλαρώνει» την εξελικτική πίεση για πρόσληψή τους από το διαιτολόγιο.

Το θεραπευτικό ενδιαφέρον για την αποκατάσταση αρχέγονων μηχανισμών του μικροβιώματος μέσω εμπλουτισμού του με εκλιπόντα είδη είναι προφανές (π.χ. μεταμόσχευση κοπράνων).

## 1.3 Λειτουργίες εντερικού μικροβιώματος

Λειτουργίες ανθρώπινου μικροβιώματος<sup>(2,5)</sup> :

- Ανάπτυξη ανοσολογικών μηχανισμών
- Άμυνα έναντι παθογόνων οργανισμών
- Συμβολή στην ομοιοστασία θρεπτικών στοιχείων:
  - Βιταμινών (B12, θυαμίνη, ριβοφλαβίνη, VitK)
  - Παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (short-chain fat acids \_SCFA) για τον ξενιστή
  - Αποθήκευση λιπών
- Ρύθμιση κεντρικού νευρικού συστήματος
- Ευόδωση αγγειογένεσης στο έντερο

### 1.3.1 Μεταβολισμός

Το δεδομένο ότι το εντερικό μικροβίωμα είναι εξοπλισμένο με εκατονταπλάσιο γονιδιακό δυναμικό συμβάλλει καθοριστικά στις ανθρώπινες μεταβολικές διαδικασίες.

Η παραγωγή βιταμινών, η σύνθεση όλων των απαραίτητων και μη αμινοξέων και οι βιομετατροπές της χολής, πραγματοποιούνται καθοριστικά από τη δράση του εντερικού μικροβιώματος.

Το εντερικό μικροβίωμα προσφέρει ζωτικές βιοχημικές οδούς για το μεταβολισμό των άπεπτων υδατανθράκων. Σε αυτούς συγκαταλέγονται: 1) μεγάλοι πολυσακχαρίτες (ανθεκτικά άμυλα, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πεκτίνες, gums), 2) μερικοί ολιγοσακχαρίτες που διαφεύγουν της πέψης, 3) μη-απορροφήσιμα διατροφικά σάκχαρα και αλκοόλες 4) βλέννες προερχόμενες από τον ξενιστή.

Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων είναι μείζων μηχανισμός παραγωγής ενέργειας στο κόλον. Αυτή η παραγωγή ενέργειας είναι επωφελής τόσο για τον ξενιστή όσο και για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων.<sup>(8)</sup>

### 1.3.2 Αμυντικό σύστημα

#### 1.3.2.1 Ανάπτυξη Ανοσολογικών Μηχανισμών

Μεταξύ του ανοσολογικού μας συστήματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος παρεμβάλλεται το εντερικό επιθήλιο. Αυτό από νωρίς στην ανθρώπινη ανάπτυξη, αμέσως μετά την γέννηση από στείρο στην ενδομήτρια ζωή αποικίζεται μικροβιακά<sup>(9)</sup>. Διαθέτοντας ειδικούς υποδοχείς, που αναγνωρίζουν και συνδέονται σε εξειδικευμένα μόρια συσχετιζόμενα με βακτήρια, οδηγείται στην ανάπτυξη ανοσολογικής απάντησης. Προκύπτει, λοιπόν, παραγωγή προστατευτικών πεπτιδίων, κυτοκίνων και λευκοκυττάρων. Αναπτύσσει προστατευτική απάντηση σε συμβιωτικά βακτήρια καθώς και φλεγμονώδη αντίδραση σε παθογόνους



οργανισμούς. Μπορεί να πυροδοτήσει ακόμη και μηχανισμό κυτταρικής αυτοκαταστροφής του εντερικού επιθηλίου.

Τυχάνει ευρείας αποδοχής, η υπόθεση ότι, το εντερικό μικροβίωμα διεγείρει το ανοσολογικό μας σύστημα εκπαιδεύοντάς το στα αντιγόνα. Η διαταραχή του εντερικού μικροβιώματος στα πολύ πρώιμα στάδια της ανθρώπινης ζωής, μπορεί να οδηγήσει σε απρόσφορη ανοσολογική εκπαίδευση. Οι αλλεργικές αντιδράσεις αποτελούν υπεραντιδραστική απάντηση σε αντιγονικούς ερεθισμούς που στην πλειονότητά τους είναι μη – παθογόνοι. Πράγματι, ερευνητικά δεδομένα από αλλεργικά βρέφη και παιδιά καταγράφουν διαφορετική σύσταση εντερικού μικροβιώματος από ότι στα αντίστοιχα που δεν εκδηλώνουν αλλεργία. Διανοίγονται, λοιπόν, θεραπευτικές επιλογές για πρόληψη των αλλεργιών, αξιοποιώντας την έκθεση σε κατάλληλο εντερικό μικροβίωμα.

### **1.3.2.2 Προστατευτικός ανταγωνισμός (competitive–exclusion effect/barrier)**

α) Τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου διαθέτουν συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης για τα μικρόβια. Ο ανταγωνισμός μεταξύ παθογόνων μικροβίων και μη-παθογόνων ενοίκων του εντερικού μικροβιώματος μπορεί, αν όχι να εμποδίσει την πρόσδεση των παθογόνων, τουλάχιστον να μειώσει ποσοτικά την είσοδό τους (παθογόνο βακτηριακό φορτίο).<sup>(10)</sup>

β) Προστασία μπορεί να προκύψει λόγω ανταγωνισμού μεταξύ παθογόνων και μη μικροβίων, για θρεπτικά συστατικά στο εντερικό μικροπεριβάλλον. Τα μη – παθογόνα μικρόβια του εντέρου συνήθως διαθέτουν το αριθμητικό πλεονέκτημα.<sup>(10)</sup>

γ) Επιπλέον η παραγωγή αντι-μικροβιακών ουσιών από το εντερικό μικροβίωμα μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων. Οι ουσίες αυτές, βακτηριοκίνες, είναι συχνά παραγόμενες από τα εντερικά βακτήρια.<sup>(10)</sup>

### **1.3.3 Εντερικο-εγκεφαλικός άξονας**

Ο εντερο – εγκεφαλικός άξονας είναι ένα πολύπλοκο νευροενδοκρινικό σύστημα (κορτιζόνη, πνευμονογαστρικό, αυτόνομο νευρικό έντερο) που αξιοποιεί την ανοσολογική σηματοδότηση (κυτοκίνες) συνδέοντας επικοινωνιακά τον εγκέφαλο με το έντερο, και αμφίδρομα. Ο εγκέφαλος ελέγχει εντερικές λειτουργίες, όπως ο περισταλτισμός, η παραγωγή βλέννης και η ρύθμιση ανοσολογικών απαντήσεων. Κυκλοφορούντα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs) που παράγονται από το μικροβίωμα, επηρεάζουν την ακεραιότητα του αιμοτοεγκεφαλικού

φραγμού (μείωση διαπερατότητας εμποδίζει την είσοδο ανεπιθύμητων ουσιών). Επίσης, ουσίες παραγόμενες από το μικροβίωμα (π.χ. λεπτοσακχαρίτες, φλαζελίνες, CpG νησίδες αμεθυλίωτου DNA) επηρεάζουν την νευροανοσολογική λειτουργία, διεγείροντας παραγωγή κυτοκινών (TNFα, IL-6, IL-11) από δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και λευκοκύτταρα. Η αντίδραση σε στρεσογόνα ερεθίσματα συνοψίζει χαρακτηριστικά την αμφίδρομη λειτουργία αυτού του άξονα. Είναι καλά τεκμηριωμένη η επίδραση του stress όσον αφορά στην ακεραιότητα του εντερικού επιθηλίου, στον περισταλισμό και στις εντερικές εκκρίσεις. Οδηγεί σε σημαντικές διαφοροποιήσεις το εντερικό μικροβίωμα, τόσο στη σύνθεσή του όσο και στις μεταβολικές λειτουργίες του. Αντίστροφα, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι το εντερικό μικροβίωμα τροποποιεί την απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, εμπλεκόμενο σε αγχώδεις συνδρομές, κατάθλιψη και ψυχώσεις. Τέλος, σε ασθενείς Alzheimer, η χορήγηση προβιοτικών που βελτιώνουν την εντερική χλωρίδα ασκεί ευεργετική δράση.<sup>(11)</sup>

#### 1.4 Εμπλοκή του εντερικού μικροβιώματος σε παθογενετικούς μηχανισμούς νόσων

Πληθώρα νοσολογικών οντοτήτων έχει συνδεθεί με τη δυσλειτουργία του εντερικού μικροβιώματος. Η τεκμηρίωση αυτή της συσχέτισης κυμαίνεται από μεμονωμένες αναφορές λίγων ατόμων μέχρι μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες κοόρτης (**cohort studies**).

Η πλέον εκτεταμένα μελετημένη συσχέτιση του εντερικού μικροβιώματος είναι αυτή με τις **φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (inflammatory bowel disease-IBD)**<sup>(1,8,10,12-16)</sup>. Έχει μελετηθεί η επίδραση ως προς την ευπάθεια στη νόσο, την πιθανότητα υποτροπών και την επίτευξη ύφεσης. Παρά τις διακυμάνσεις των αποτελεσμάτων από μελέτη σε μελέτη έχουν διαμορφωθεί θέσεις ομοφωνίας σε κάποια βασικά σημεία.

##### 1.4.1 Απώλεια βακτηριακής ποικιλότητας

i) Η σημαντικότερη αλλαγή είναι η μείωση της αφθονίας του *Firmicutes* phylum που ειδικά αναφέρεται στην απώλεια του βακτηρίου *Faecalibacterium prausnitcii* με σημαντικές αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Άλλα είδη με μειωμένη αντιπροσώπευση στο εντερικό μικροβίωμα ασθενών με IBD είναι: α) *Bacteroides fragiles*, β) *B. Vulgatus*, γ) *Ruminococcus albus*, δ) *R. Callidus* και ε) *R. Bromii* που εμφανίζονται με συχνότητα 5-φορές μεγαλύτερη σε υγιείς μάρτυρες σε σύγκριση με ασθενείς IBD.<sup>(17)</sup>

ii) Πρόσφατες μεταγενεωμικές μελέτες έδειξαν ότι και η συνολική ποσότητα

βακτηρίων είναι επίσης μειωμένη στην IBD. Στη χλωρίδα των ασθενών με IBD ανιχνεύεται ένα ποσοστό μικροβιακών γονιδίων, περίπου 25% μικρότερο, από αυτό στους υγιείς. Οι Morgan et al., 2012<sup>(18)</sup> συμπεραίνουν ότι μάλλον η μείωση της αφθονίας των μεταβολικών οδών είναι ο καθοριστικός παράγοντας που μεταβάλλεται στους IBD ασθενείς, παρά αυτή καθ' εαυτή η απώλεια της βακτηριακής ποικιλότητας.

- Παρατηρούνται επίσης :
  - ✓ Αύξηση της αντιπροσώπευσης ειδικών taxa όπως τα *Enterobacteriaceae*.
  - ✓ Μείωση της σχετικής αφθονίας διαφόρων taxa εντός του *Firmicutes* *plylum*.<sup>(1,8,10,12-16)</sup>

#### **1.4.2 Δεδομένα που υποστηρίζουν το ρόλο του εντερικού μικροβιώματος στην φλεγμονώδη νόσο εντέρου (IBD)**

- i) Χρήση αντιβιοτικών βελτιώνει την πορεία της νόσου τουλάχιστον σε κάποιους ασθενείς<sup>(5)</sup>
- ii) Μοντέλα ζώων για IBD απαιτούν την παρουσία μικροβιώματος για πρόκληση φλεγμονής
- iii) Σε ασθενείς με IBD διακρίνουμε μειωμένη ποικιλότητα μικροβιώματος.
- iv) Η δυτικοποιημένη διατροφή που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση λίπους και κόκκινου κρέατος έχει συσχετισθεί με αύξηση της επίπτωσης της IBD.
- v) Αντίθετα η αυξημένη πρόσληψη φυτικών ινών και φρούτων συσχετίζεται με μείωση της συχνότητας των IBD. Συγκεκριμένα, η αυξημένη πρόσληψη φυτικών ινών δρα προστατευτικά έναντι της Νόσου Crohn, ενώ των φρούτων έναντι της ελκώδους κολίτιδας.<sup>(1,8,10,12-16)</sup>

### **1.5 Ασθένειες και εντερικό μικροβίωμα**

#### **1.5.1 Συστηματικές μεταβολικές νόσοι**

Ο όρος συστηματικές μεταβολικές νόσοι περιλαμβάνει δύο πολύ συχνές-επιδημικές για τις κοινωνίες μας νοσολογικές οντότητες, την παχυσαρκία και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

##### Παχυσαρκία

Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η παχυσαρκία συσχετίζεται με αντιστροφή του λόγου *Firmicutes/Bacteroidetes* προς όφελος των *Firmicutes*.

Πρόσφατες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν αντίστοιχα αποτελέσματα σε ανθρώπους<sup>(8)</sup>. Στις αναλύσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε 16S RNA sequencing. Η αξιοποίηση τεχνικών metagenomic sequencing ανέδειξε την ύπαρξη τριών «εντεροτύπων»: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus* που δεν έχουν σχέση με σωματικό βάρος αλλά μάλλον με τον τρόπο που διαχειρίζονται ενεργειακά τις προσλαμβανόμενες τροφές. Αναδείχθηκε ότι ο εντερότυπος 1 συσχετίζεται με κατανάλωση ζωικών πρωτεϊνών και κορεσμένων λιπών ενώ ο εντερότυπος 2 συσχετίζεται με δίαιτα εδραζόμενη στους υδατάνθρακες.<sup>(13,19)</sup>

### Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Νόσος περίπλοκη που καθορίζεται τόσο από γενετικά όσο και περιβαλλοντικά δεδομένα. Χαρακτηρίζεται από την αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το μικροβίωμα στα άτομα με ινσουλινο-αντίσταση πυροδοτεί χαμηλόβαθμη φλεγμονώδη αντίδραση στο λιπώδη ιστό. Το μικροβίωμα αυτών των ατόμων χαρακτηρίζεται από απώλεια των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό (απαραίτητα για διατήρηση ακεραιότητας εντερικού πληθυσμού σε συνδυασμό με αύξηση των βακτηρίων που αποσυνθέτουν τη βλέννη).<sup>(5)</sup>

#### **1.5.2 Αθρωμάτωση**

Ο μεταβολισμός της χοληστερόλης και των λιπιδίων από το μικροβίωμα του εντέρου μπορεί να επηρεάσει τον σχηματισμό της αθρωματικής πλάκας. Τρόφιμα πλούσια σε φωσφατιδυλοχολίνη είναι η κύρια πηγή χολίνης. Η χολίνη διασπάται από το εντερικό μικροβίωμα (*Bacteroides enterotype 1*) και σχηματίζει τριμεθυλαμίνη. Αυτή εν συνεχεία μεταβολίζεται στο ήπαρ σε οξειδίο τριμεθυλαμίνης. Ο βακτηριακός μεταβολίτης trimethylamine-N-oxide θεωρείται βλαπτικός για αθρωμάτωση. Αντίστοιχα, η κατανάλωση χολίνης έχει θετική συσχέτιση με το δυτικού τύπου διατροφικό μοντέλο.<sup>(5,20)</sup>

#### **1.5.3 Αλλεργικές αντιδράσεις**

Το ατοπικό έκζεμα, το εξωγενές βρογχικό άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα και οι τροφικές αλλεργίες ανήκουν στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας τύπου I. Οι ασθενείς σε ηλικία μικρότερη ή ίση των 2 ετών εμφανίζουν την ατοπική ευαισθητοποίηση. Αυτή μπορεί να επιμείνει εφ' όρου ζωής διανύοντας μία διαδρομή (ατοπική διαδρομή) από το έκζεμα, στο άσθμα (>5 έτη), ή την ρινίτιδα (>8 έτη).

Τα βρέφη ηλικίας ενός μήνα που εμφανίζουν ατοπικό έκζεμα παρουσιάζουν μειωμένη ποικιλότητα εντερικού μικροβιώματος, ιδιαίτερα

του *Bacteroides phylum* σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Το χαρακτηριστικό αυτό διατηρείται μέχρι και ένα έτος μετά. Τα ίδια άτομα θεωρείται ότι λόγω χαμηλότερου αριθμού σε *Proteobacteria* (πλούσιο τοίχωμα σε λιποσακχαρίτες) εμφανίζουν μικρότερη έκθεση σε λιποσακχαριδικό αντιγονικό ερεθισμό.

Αναμφίβολα καταγράφεται παγκόσμια αύξηση των αλλεργικών νόσων την τελευταία πενήνταετία που εμφανίζουν επίπτωση της τάξης του 20% του πληθυσμού. Η **ελλιπής έκθεση σε μικροβιακά αντιγόνα**, που ονομάστηκε **Hygiene Hypothesis**, προτάθηκε ως ερμηνευτικό μοντέλο αυτού του φαινομένου.<sup>(5)</sup>

#### 1.5.4 Καρκίνος

Πληθώρα μεταγενωμικών μελετών σε ανθρώπους ανίχνευσαν συσχέτισμό δομών μικροβιώματος με συγκεκριμένους καρκίνους<sup>(15,16,21,22)</sup>.

Υπολογίζεται ότι 20% των όγκων παγκόσμια, συσχετίζονται με μικρόβια.

Παρεμβάσεις στο μικροβίωμα προκαλούν τροποποίηση της ογκογόνου συμπεριφοράς διαφόρων καρκίνων. Χαρακτηριστικά σε **MALT (Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue)** λέμφωμα έχουμε αξιόλογα θεραπευτικά αποτελέσματα με τη χρήση συνδυασμένης αγωγής αντιβιοτικών (Amoxicillin, Clarithromycin) και μίας πραζόλης. Παρόμοια σε λέμφωμα MALT οφθαλμικό, με χορήγηση doxycycline επετεύχθη ύφεση. Το πρώτο λέμφωμα συσχετίζεται με το μικρόβιο *Helicobacter pylori*, ενώ το δεύτερο λέμφωμα με το μικρόβιο *Chlamydia psittaci*.

Δύο άλλα βακτήρια που εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με καρκινογένεση είναι το *H.pylori* και το *Fusobacterium nucleatum*, σε καρκίνους γαστρικούς και ορθοκολικούς αντίστοιχα<sup>(15,16,21,22)</sup>. Ακόμη, το μικρόβιο *Propionibacterium acnes* έχει συσχετισθεί με καρκίνο προστάτη.

Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να ερευνηθούν την ογκογένεση που συσχετίζεται με μικρόβια. Αρχικά έχουν ενοχοποιηθεί βακτηριακές τοξίνες με γενετοξικές και μη ιδιότητες (π.χ. *E.coli*, *B fragilis*). Ακόμη έχουν διαπιστωθεί μηχανισμοί διαφυγής από την ανοσοεπιτήρηση μέσω επαγωγής **MDSCs (myeloid derived suppressor cells)** στο μικροπεριβάλλον του όγκου (π.χ. *Fusolacterium nucleatum*). Βακτήρια όπως το *Propionibacterium acnes* προκαλούν ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση στον προστατικό ιστό, μέσω κυκλοοξυγένεσης-2 (COX-2) σηματοδότησης και είναι σταθερό εύρημα σε αντίστοιχους καρκινικούς ιστούς.

Το εντερικό μικροβίωμα ασκεί ογκογόνο δράση και μακριά από τον εντερικό σωλήνα. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με ηπατοκυτταρικό

καρκίνο, η χορήγηση αντιβιοτικών απεδείχθηκε επιτυχής για αναστολή καρκινογένεσης ακόμη και σε τελικά στάδια με παρούσα ήδη την ίνωση (ενοχοποίηση μικροβιακών λιποπολυσακχαριτών -LPS). Παρόμοια, για το χολαγγειοκαρκίνωμα ενοχοποιείται το deoxycholic acid που παράγεται από clostridium.<sup>(15,16,21)</sup>

Παρατηρείται όμως και προστατευτική δράση μικροβιώματος έναντι του καρκίνου. Χρησιμοποιείται ήδη από πολύ παλιά σε ανοσοθεραπεία βασισμένη σε μικρόβια, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (BCG) και του σαρκώματος (Coley's toxin).

Επιπρόσθετα, αξιοποιείται η δράση του μικροβιώματος ως ρυθμιστή χημειοθεραπείας.

i) Σε ανθρώπους με καρκίνο του παγκρέατος, το μικροβίωμα του όγκου είναι εμπλουτισμένο με *GammaProteobacteria* συμπεριλαμβανομένου *Mycoplasma hyorhinis*. Σε ποντίκια αυτό το μικροβίωμα ενοχοποιήθηκε για πρόκληση αντιστάσης στο χημειοθεραπευτικό Gemcitabine που καταστρέφεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η χορήγηση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin αποκατέστησε τη δράση του χημειοθεραπευτικού.

ii) Σε ανοσοθεραπεία με check-point inhibitors anti-PDL-1 η απάντηση του όγκου (νεφρού, ουροδόχου, πνεύμονα) επηρεάζεται δραματικά από το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα.<sup>(15,16,21,22)</sup>

## 2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Αρχικά, οι στρατηγικές ανίχνευσης βακτηρίων περιελάμβαναν μεθόδους παρατήρησης της βακτηριακής ανάπτυξης (χρώσεις, μικροσκοπία, καλλιέργειες), καθώς επίσης και ταξινόμηση βασισμένη σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Οι ανωτέρω μέθοδοι αν και αποστέλλουν την καθημερινή πρακτική των κλινικών μικροβιολογικών εργαστηρίων «δεν παρέχουν επαρκή ευαισθησία για την ανίχνευση ούτε επαρκή ειδικότητα για την ταυτοποίηση και την τυποποίηση του στελέχους»<sup>(23)</sup>. Επιπλέον, απαιτούν χρόνους ταυτοποίησης 4 - 48 h με κόστος της τάξης των 4,6-12,6 € για κάθε ανιχνευμένη βακτηριακή αποικία.

### 2.1 Μοριακές τεχνικές<sup>(23-25)</sup>

- Οι τεχνικές αυτές διαθέτουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν βακτήρια σε επίπεδο στελέχους με ακρίβεια, προσφέροντάς μας το γενετικό αποτύπωμά του (fingerprint).
- Οι τρέχουσες μέθοδοι γονοτυπικής ανίχνευσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε: 1) Ανάλυση μοτίβου DNA (DNA banding), 2) Ανάλυση ακολουθίας DNA (DNA sequencing), 3) DNA Υβριδισμός
- Γονιδιακές περιοχές που αξιοποιούνται στη βακτηριακή γονοτύπηση :
  - Το 16S rRNA γονίδιο
  - 16S-23S-5S rRNA ITS περιοχή
  - groB και άλλα γονίδια

### 2.2 “Culturomics” - Αναγέννηση καλλιεργειών και μελέτη εντερικού μικροβιώματος<sup>(26-28)</sup>

Οι Lagier et al.,<sup>(27,28)</sup> εισήγαγαν τον όρο “**culturomics**” για τεχνικές **high-throughput καλλιεργειών**. Δεν είναι λιγότερο αποτελεσματικές από ότι οι μοριακές τεχνικές (pyrosequencing) για τη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος.

Η μεθοδολογία συνίσταται σε χρήση ειδικών ή/και εκλεκτικών καλλιεργητικών υλικών, συνδυασμένη με ανίχνευση μέσω MALDI-TOF. Η νέα αυτή προσέγγιση στη μελέτη μικροβιακών οικοσυστημάτων είναι εξοπλισμένη με τα εξής πλεονεκτήματα:

1) Έχει δυνατότητες να ανιχνεύει μειοψηφικούς πληθυσμούς (χαμηλές συγκεντρώσεις). Έχει την ικανότητα να αυξήσει κατά το 1/3 το φάσμα των ανιχνευόμενων μικροβίων σε σχέση με την 16S rRNA amplification. (pyrosequencing).

2) Δεν περιορίζεται στα ευβακτήρια.

3) Παρέχει στελέχη που επιτρέπουν εκτενή χαρακτηρισμό «νέων» ειδών καθώς και τις διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηριακών στελεχών ενός δεδομένου μικροβιώματος.

4) Οι καλλιεργητικές τεχνικές υπερέχουν των μοριακών τεχνικών στην εκτίμηση της **βιωσιμότητας (viability)** των ανιχνευθέντων οργανισμών.

5) Ένα καθόλου αμελητέο πλεονέκτημα των **καλλιεργητικών μεθόδων (culturomics)** είναι η δυνατότητα απομόνωσης του στελέχους του ίδιου με άμεσες εφαρμογές σε θεραπευτικούς χειρισμούς, όπως τη μεταμόσχευση μικροβιώματος.

Το κύριο μειονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι η αδυναμία των «μη καλλιεργούμενων» μικροοργανισμών. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι στην πλειονότητά τους αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι αυστηρά αναερόβιοι, αποτελώντας έτσι μία πρόκληση για βελτίωση των αναερόβιων καλλιεργείων.

Οι high-throughput καλλιέργειες (culturomics) είναι μία από τις μεθόδους που στοχεύουν να ανιχνεύσουν μειοψηφικές βακτηριακές κοινότητες.<sup>(27,28)</sup>

### 2.2.1 Η MALDI-TOF/MS στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών

Ως γνωστόν η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον ιονισμό του δείγματος και εν συνεχεία στο διαχωρισμό των ιόντων ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο. Εκ των διαφόρων μεθόδων ιονισμού, η **MALDI-TOF [matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight] (ιονισμός εκρόφησης με laser παρουσία υποβοηθητικής ουσίας –χρόνος πτήσεως)** βρίσκει άμεσες εφαρμογές στα κλινικά εργαστήρια.

Η εισαγωγή της MALDI-TOF MS προκάλεσε την πιο σημαντική τεχνολογική αλλαγή στο χώρο της κλινικής μικροβιολογίας. Δε χρειάστηκαν παρά λίγα χρόνια για να γίνει από μια καινοτόμο προσέγγιση, μέρος της καθημερινής ρουτίνας των κλινικών εργαστηρίων τουλάχιστον σε Γαλλία και Ισπανία. Καταγράφουμε μερικά από τα πλεονεκτήματα της MALDI-TOF έναντι των συμβατικών μεθόδων που προκάλεσαν αυτή την «επανάσταση»:

1) Τρομακτική εξοικονόμηση χρόνου απαιτώντας ελάχιστους χρόνους σε κάποια δείγματα που είναι εφικτή η άμεση ανίχνευση (π.χ. αίμα-ούρα) έως



το πολύ 4h-8h για δείγμα από πολύ πρώιμα καλλιεργητικά υλικά. Έναντι των 24h-48h των συμβατικών μεθόδων και μερικές φορές (π.χ. μυκοβακτήρια, μύκητες) πάρα πολύ περισσότερα.

2) Η ανάλυση του πρωτεϊνικού προφίλ των μικροοργανισμών στο φάσμα 2-20kDa που περιλαμβάνει τη συντριπτική πλειοψηφία των ριβοσωμικών πρωτεϊνών επιτρέπει την ταυτοποίησή τους με αξιοπιστία παραπλήσια αυτής που επιτυγχάνουμε με 16S rRNA αλληλούχιση.

3) Η αλληλούχιση, όμως, με 16S rRNA είναι περίπου 100 φορές ακριβότερη από ότι με MALDI-TOF MS.

Τα επόμενα χρόνια η MALDI-TOF πρέπει να ανταποκριθεί σε δύο σημαντικές προκλήσεις:

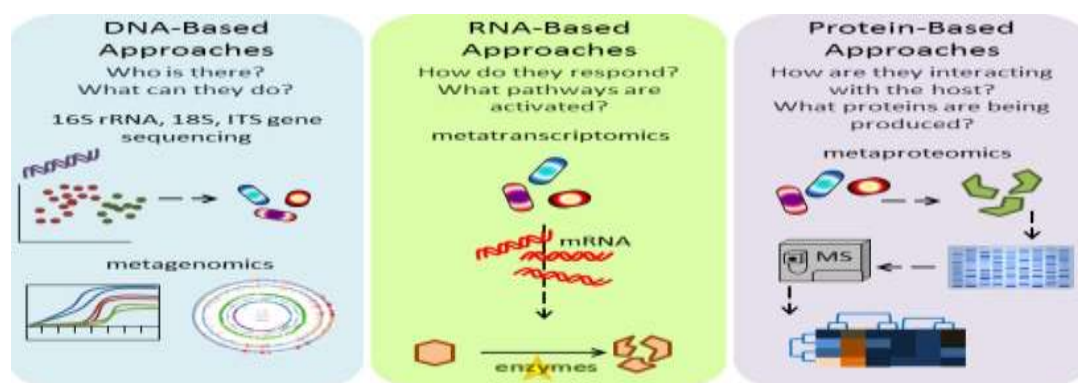
1) Επί του παρόντος οι υπάρχουσες βάσεις δεδομένων είναι σχετικά περιορισμένες, καθιστώντας την ασφάλεια ταυτοποίησης σπάνιων ειδών προβληματική. Οι Verroken et al., 2010<sup>(29)</sup> υπερπήδησαν αυτό το εμπόδιο εργαζόμενοι σε δύο αλληλοδιάδοχα στάδια. Αρχικά ανιχνεύοντας 110 είδη *Nocardia* κατασκεύασαν την ελλείπουσα βάση δεδομένων. Στη συνέχεια προχώρησαν στην ανίχνευση 43 άλλων στελεχών.

2) Επίλυση διχογνωμιών στην ταυτοποίηση μερικών γενών ακόμη και από τα συχνά απαντώμενα στην κλινική μικροβιολογία. Επί παραδείγματι, η διάκριση μεταξύ *Streptococcus mitis* και *Streptococcus pneumoniae* δεν είναι ακριβής με MALDI-TOF, όπως μεταξύ *Bacillus anthracis* και *Bacillus cereus* ή *E. Coli* με *Shigella spp.*

Παρά ταύτα η χρήση MALDI-TOF MS αναδεικνύεται σε εξαιρετικό εργαλείο που συνέβαλε καθοριστικά στη διερεύνηση της γνώσης μας στο πεδίο της βιοποικιλότητας.

Η αξιοποίηση της MALDI-TOF MS μελέτες culturomics πέτυχε δύο σημαντικά επιτεύγματα. Αφ' ενός περιορίσε σημαντικά την αναγκαιότητα για χρήση **NGS (Next Generation Sequencing)** και αφ' ετέρου επέτρεψε την εκτίμηση αντιβιοτικής ευαισθησίας.<sup>(27,28,30)</sup>

## 2.3 Αναλύσεις “META-MULTI-OMICS” στο εντερικό μικροβίωμα



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση των τριών κυρίαρχων μετα-ωμικών προσεγγίσεων

### 2.3.1 Μετα-γονιδιωματική

Η Μετα-γονιδιωματική ή Περιβαλλοντική Γονιδιωματική είναι μια τεχνική που ανακτά για ανάλυση γενετικό υλικό απευθείας από το προς μελέτη περιβάλλον δίχως καλλιέργεια.

Η Μετα-γονιδιωματική, από την πρώτη εφαρμογή της το 2006, στη μελέτη του ανθρώπινου μικροβιώματος συνέβαλε καθοριστικά στη διερεύνηση του ρόλου του εντερικού μικροβιώματος στην ανθρώπινη υγεία και ασθένεια. Στοχεύοντας στην ανίχνευση όλου του DNA του δείγματος απαντά στο ερώτημα «Ποιο είναι το γονιδιακό δυναμικό του δείγματος; Ποια η μικροβιακή σύνθεση;»

Η μελέτη αυτή υλοποιείται με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις:

1η) **Στοχευμένη μετα-γονιδιωματική μελέτη (targeted metagenomics)** π.χ. μιας μεταβλητής περιοχής του 16S rRNA είτε με Sanger sequencing είτε με NGS.

2η) Shotgun metagenomics, όπου έχουμε αλληλουχίες ολόκληρου του DNA του δείγματος που δίχως a priori γνώση του γενετικού περιεχομένου του υλικού, επιτρέπει τη σφαιρική περιγραφή των υπάρχοντων μικροοργανισμών. Επιπλέον η Shotgun metagenomics προσέγγιση, σε αντίθεση με τη στοχευμένη μετα-γονιδιωματική, επιτρέπει λειτουργικές αναλύσεις.

Οι δύο αυτές προσεγγίσεις της μετα-γονιδιωματικής ερμηνεύουν διαφορετικές πλευρές του εντερικού μικροβιώματος, καθεμιά με τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματά της. Η στοχευμένη μετα-γονιδιωματική μας προσφέρει την ταυτότητα των παρόντων μικροοργανισμών, ενώ η Shotgun μας ερμηνεύει το λειτουργικό δυναμικό του οικοσυστήματος. Οι δύο, λοιπόν, προσεγγίσεις προσφέρουν

συμπληρωματικές θεωρήσεις του μικροβιώματος οδηγώντας μας σε πληρέστερη σφαιρική αντίληψη.<sup>(31-34)</sup>

### 2.3.1.1 Περιορισμοί της μετα-γονιδιωματικής

Εξαιρετικά σημαντικό στην εκτίμηση του ρόλου της μετα-γονιδιωματικής στη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος είναι η υπενθύμιση ότι δεν αποτελεί παρά στιγμιαία φωτογραφική απεικόνιση. Περιορισμοί της μεθόδου είναι:

- 1) DNA extractions bias. Διαφορετικά πρωτόκολλα εξαγωγής DNA διαφέρουν στις τελικές ταξινομητικές συνθέσεις των μικροβίων.
- 2) Ερμηνεία αλληλουχιών που αποδίδονται σε άγνωστα είδη. Ως γνωστόν η πλειονότητα των βακτηρίων του εντερικού μικροβιώματος δεν έχει ακόμα καλλιεργηθεί, με συνέπεια το γονιδίωμα τους να παραμένει άγνωστο.
- 3) Δραστηριότητα καθενός ανιχνευόμενου βακτηρίου (Ενεργό ή όχι). Σε αυτό το ερώτημα απάντηση μπορεί να δοθεί με RNA αλληλούχιση δηλαδή, με τη **μετα-μεταγραφωματική (meta- transcriptomics)**.<sup>(35)</sup>

### 2.3.2 Μετα-μεταγραφωματική

Η αλληλούχιση του μεταγραφώματος (**transcriptome sequencing**), ολόκληρου του μεταγραφώματος (**whole-transcriptomics sequencing**) ή **RNA (c-DNA) sequencing** είναι μια προσέγγιση όπου όλο το RNA που παραλαμβάνεται από ένα περιβαλλοντικό δείγμα μετατρέπεται σε c-DNA, αλληλουχείται και αναλύεται για να προσδιοριστούν οι λειτουργικές δραστηριότητες των μικροβιακών πληθυσμών. Στην αλληλούχιση του συμπληρωματικού c-DNA, τα δεδομένα από την RNA-seq συμπεριλαμβάνουν όλους τους διαφορετικούς πληθυσμούς του ολικού RNA (mRNA, miRNA, tRNA, siRNA και sRNA). Με την αλληλούχιση του RNA μπορούμε να προσδιορίσουμε εάν τα διαφορετικά μικρόβια στην ίδια κοινότητα είναι ενεργά στις ίδιες μεταβολικές οδούς.

Η μετα-μεταγραφωματική πέραν της ικανότητας να διακρίνει μεταξύ ενεργών και παθητικών μελών μιας μικροβιακής κοινότητας δίνει τη δυνατότητα να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ γονιδιακής έκφρασης και περιβαλλοντικών παραμέτρων. Επιπλέον μπορεί να αναδεικνύουν ομάδες γονιδίων απαραίτητων για τη μικροβιακή ανάπτυξη που η σημασία τους δεν είναι προφανής από τη μετα-γονιδιωματική ανάλυση.

Άμεση εφαρμογή της μετα-μεταγραφωματικής στην κλινική Μικροβιολογία μπορεί να δώσει πληροφόρηση για τη λοιμογόνο δύναμη και άλλους δείκτες παθογόνου δράσης με αξιοποίηση στην Παθολογία και Επιδημιολογία. Η Valeria D'Argenio<sup>(36)</sup> συμπεραίνει ότι με την περαιτέρω βελτιστοποίηση και τυποποίηση της ανάλυσης δεδομένων, η μετα-μεταγραφωματική μπορεί να αναδειχθεί σε πολύ δημοφιλή προσέγγιση, καθώς μπορεί να προσφέρει, αδιανόητες μέχρι τώρα, δυνατότητες συσχέτισμού συγκεκριμένων μικροβίων με συγκεκριμένες βιοχημικές και μεταβολικές λειτουργίες.

Οι δυνατότητες που προκύπτουν με το συνδυασμό μεταγενωματικών και μεταγραφικών δεδομένων είναι ιδιαίτερα υποσχόμενες για τη μελέτη του ανθρώπινου μικροβιώματος ιδιαίτερα του εσωτερικού.<sup>(34)</sup>

### 2.3.2.1 Περιορισμοί της μετα-μεταγραφωματικής

1. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς το mRNA είναι εξαιρετικά λιγιστό.
2. Τα μεταγραφώματα του mRNA δεν αντιπροσωπεύουν αναγκαστικά μικροβιακές λειτουργίες, καθώς αυτές σε τελική ανάλυση εκφράζονται κυρίως με πρωτεϊνικές λειτουργίες.
3. Με δεδομένη την ασύγκριτα μεγαλύτερη σταθερότητα των πρωτεϊνών από το mRNA, η πρωτεομική ανάλυση προσφέρει πληρέστερη πληροφόρηση για τη λειτουργικότητα του μικροβιώματος.<sup>(33)</sup>

### 2.3.3 Μετα-πρωτεωμική

Η μετα-πρωτεωμική ορίζεται ως ευρείας κλίμακας χαρακτηρισμός του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράζονται από ένα σύνθετο μικροβιακό οικοσύστημα. Η ανεκτίμητη συμβολή της στη λειτουργική κατανόηση του εντερικού μικροβιώματος είναι καλά τεκμηριωμένη. Προσφέρει σημαντική κατανόηση τόσο των μεταβολικών δραστηριοτήτων όσο και των διαδραστικών σχέσεων μικροβιώματος και ξενιστή. Η μετα-πρωτεωμική έχει τη δυναμική να αποκρυπτογραφήσει τις περίπλοκες σχέσεις μικροβιώματος –ξενιστή σε υγεία και **ασθένεια (δυσβίωση)**.<sup>(34,37)</sup>

Από την πρώτη Shotgun μετα-πρωτεωμική μελέτη ανθρώπινου εντερικού μικροβιώματος το 2009 μέχρι σήμερα οι αντίστοιχες μελέτες που καταγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία δεν είναι ευάριθμες. Οι X.Zhang et al., 2016<sup>(38)</sup> το αποδίδουν σε:

- 1) Περιορισμένες δυνατότητες της φασματομετρίας μάζας στην ανίχνευση με επάρκεια πρωτεϊνών σε χαμηλές συγκεντρώσεις και κυρίως
- 2) Χαμηλή αποτελεσματικότητα στην αντιστοίχιση των φασματομετρικών φασμάτων με τα μικροβιακά πεπτίδια ή πρωτεΐνες με κυρίαρχα αίτια την

ανεπάρκεια κατάλληλων βάσεων δεδομένων (peptide-spectra matching – psm).

Η σχετικά πρόσφατη (2014) δημοσίευση σχεδόν πλήρους καταλόγου γονιδίων εντερικού μικροβιώματος ανθρώπου και ποντικού θα βοηθήσει καθοριστικά στην ανίχνευση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στην μετα-πρωτεωμική ανάλυση. Πράγματι οι X.Zhang et al., 2016<sup>(38)</sup> δημοσίευσαν μια υψηλής απόδοσης μεθοδολογία μετά **PRO-IQ (Proteome Identification and Qualification)** που προσεγγίζει σφαιρικά και γενικευμένα το εντερικό μικροβίωμα (ανίχνευση και ποσοτικοποίηση). Η μετά PRO-IQ μεθοδολογία θέτει προαπαιτούμενο να προηγηθεί μετα-γενωματική αλληλούχιση επιταχύνοντας σημαντική συρρίκνωση κόστους τέτοιων μελετών. Επιπλέον προσφέρει δυνατότητες αξιοποίησής της από πληθώρα διαφορετικών ενδιαφερόντων ερευνητές σε καταστάσεις υγείας και ασθένειας.

### 2.3.3.1 Η φασματομετρία μάζας πολύτιμο εργαλείο πρωτεωμικής / μετα-πρωτεωμικής ανάλυσης

Η περασμένη δεκαετία μας προσέφερε γοργές τεχνολογικές εξελίξεις στη **φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry-MS)**, που αύξησαν την διακριτική ικανότητα, την ακρίβεια προσδιορισμού μάζας, την ευαισθησία και επιτάχυναν τους ρυθμούς της. Ως επιστέγασμα των ραγδαίων αυτών τεχνολογικών εξελίξεων εμφανίστηκαν «υβριδικά» φασματομέτρα μάζας, όπως για παράδειγμα το Linear Ion Trap –Orbitrap Series βελτιώνοντας σημαντικά την πρωτεωμική ανάλυση<sup>(39)</sup>.

### 2.3.3.2 Προσεγγίσεις στην πρωτεωμική / μετα-πρωτεωμική ανάλυση με φασματομετρία μάζας

Στην πρωτεωμική ανάλυση ακολουθούνται 3 διακριτές στρατηγικές<sup>(39,40)</sup>:

I) **“Bottom-up” μέθοδοι**, που είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς. Οι πρωτεΐνες πέπτονται (ενζυματικά ή χημικά) πριν το διαχωρισμό και την ανάλυση με MS.

Μέθοδοι διαχωρισμού: α) **Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC)**. Όταν ο διαχωρισμός σε μείγμα πρωτεϊνών γίνεται με LC και ερευνάται με m/s χαρακτηρίζεται ως Shotgun Proteomics. β) Ηλεκτροφόρηση με **πηκτική (gel)**.

II) **“Top-down” μέθοδος**, ταχέως αναδυόμενη λόγω : α) οργανολογίας (π.χ. Orbitrap), β) προόδου τεχνολογίας διαχωρισμού πρωτεϊνών, γ) κατάλληλων βιοπληροφορικών εργαλεία.

### Πλεονέκτημά της:

- ✓ Ότι δεν απαιτείται να προηγηθεί πέψη πρωτεϊνών, επομένως προσφέρει δυνατότητες μέτρησης ακέραιου μορίου.
- ✓ Παρέχει υψηλής ποιότητας δεδομένα και κυρίως
- ✓ είναι ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο ειδικά στη μελέτη μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ. γλυκοζυλιώσεις, μεθυλιώσεις κλπ.) PTM και ισόμορφων πρωτεϊνών.

Η “Top-down” στρατηγική αντιμετωπίζει, όμως, σημαντικές προκλήσεις όπως την ανάλυση πρωτεϊνών με μέγεθος  $\geq 70$  kDa

Συγκρίνοντας τις δύο στρατηγικές η “bottom-up” προσέγγιση εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία από την “top-down”.

### III) “Middle-down” μέθοδος

Πρόσφατα μια «υβριδική» στρατηγική “middle-down” πρωτεομική αναπτύσσεται υπερπηδώντας την αδυναμία της “bottom-up” ανιχνεύοντας μεγαλύτερα πεπτιδικά θραύσματα λειτουργώντας πρακτικά με τα πλεονεκτήματα της “top-down” προσέγγισης.

#### 2.3.3.3 Η μετα-πρωτεωμική κοπράνων ως πηγή αξιοποίησης βιοδεικτών

**Βιοδείκτης ορίζεται ένα μόριο, το οποίο μπορεί να υποδείξει αλλαγές της φυσιολογικής κατάστασης ενός ατόμου σε υγεία ή ασθένεια, φαρμακευτική αγωγή, τοξική ή άλλη περιβαλλοντική επίδραση.** Αναλόγως την κλινική του χρήση μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις υποομάδες : 1) διαγνωστικός, 2) προγνωστικός, 3) θεραπευτικός και 4) προληπτικός.<sup>(41)</sup>

Οι Jin et al.,2017<sup>(42)</sup> αναδεικνύουν την μετα-πρωτεομική ανάλυση κοπράνων ανθρώπου ως ένα δυνητικά πολύτιμο εργαλείο για ανεύρεση βιοδεικτών συσχετιζόμενων με παθολογία του εντέρου όπως καρκίνος παχέως εντέρου, **φλεγμονώδεις εντεροπάθειες (inflammatory bowel disease- IBD), ευερέθιστο έντερο (irritable bowel syndrome - IBS)**, κοιλιόκακης. Η εισαγωγή τους στην καθημερινή κλινική πράξη προϋποθέτει ότι θα είναι εξοπλισμένοι με τη μέγιστη ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς επίσης θα διαθέτουν και την απαραίτητη επικύρωση για τους στοχευμένους πληθυσμούς. Τέτοιοι βιοδείκτες μπορούν, αξιοποιώντας τα “Big Data” να ενσωματωθούν σε στρατηγικές Personalised Medicine. Ως τέτοιες προσπάθειες καταγράφονται :

1. lipocalin-2 (NGAL): πρωτεΐνη εξαιρετικά σταθερή στα κόπρανα, έχει προταθεί για IBD

2. zinc-alpha 2 glucoprotein (ZAG): εμπλεκόμενη στον μεταβολισμό των λιπιδίων έχει προταθεί για CRC
3. orosomucoid (ORM) /or alpha-1-glycoprotein, πρωτεΐνη οξείας φάσης που έχει συσχετισθεί με εντερικές λοιμώξεις και UC
4. η πρωτεϊνική τριάδα : καλπροτεκτίνη, παγκρεατική ελαστάση και ηωσινοφιλική πρωτεΐνη X συνδέθηκε με IBS
5. η αναζήτηση ενός προβλεπτικού μοντέλου του γαστρεντερικού μεταβολώματος μέσω ενός μεταβολικού αποτυπώματος των κοπράνων (UHPLC – Orbitrap HRMS)

### 3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

#### 3.1 Το *Citrobacter rodentium* ως μοντέλο μελέτης εντερικής βακτηριακής λοίμωξης στα ποντίκια

Το *Citrobacter rodentium* είναι ένα Gram(-) βακτήριο, αποκλειστικά παθογόνο στα ποντίκια. Στο φυσικό ξενιστή του προκαλεί φλεγμονώδη υπερπλασία του επιθηλίου στο κόλον που εκδηλώνεται με διάρροια και διαταραχή λειτουργικότητας<sup>(43)</sup>. Προσφέρει, όμως, ένα μοντέλο μελέτης εντερικής βακτηριακής λοίμωξης σε ένα βολικό ζωικό μοντέλο, που είναι ο χρυσός κανόνας για τη μελέτη της λοιμογόνου δράσης εντερικών παθογόνων του ανθρώπου, όπως τα **εντεροπαθογόνα στελέχη (EPEC) και εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC) της E.Coli**. Αυτό συμβαίνει διότι και τα 3 παθογόνα (*C.rodentium*, EPEC, EHEC) προκαλούν πανομοιότυπες ιστολογικές βλάβες, “Attacking” and “Effacing”, στο εντερικό επιθήλιο. Αυτές συνοψίζονται στην τριάδα : 1) υπερπλασία εντερικών κρυπτών, 2) εξαφάνιση των goblet cells, 3) επιθηλιακές αλλαγές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μοιράζονται ένα κοινό, καλά διατηρημένο, **γονιδιακό τόπο (locus)** παθογενητικότητας επί του εντερικού επιθηλίου.<sup>(44,45)</sup>

Οι Berger et al.,2017<sup>(46)</sup> περιέγραψαν μηχανισμούς που χρησιμοποιεί το *C.rodentium* για να χειρίζεται το μεταβολισμό του ξενιστή, ώστε αφ' ενός να καταστρατηγήσει τους μηχανισμούς φυσικής ανοσίας των επιθηλιακών κυττάρων στο έντερο του ξενιστή και αφ' ετέρου για να διαμορφώσει ένα ευνοϊκό για αυτό εντερικό οικοσύστημα έτσι ώστε να επιβιώσει. Οι δράσεις του εξελίσσονται σε τρία επίπεδα. Αρχικά, κινητοποιεί το ενεργειακό δυναμικό στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου (αερόβια γλυκόλυση, παραγωγή φωσφοκρεατινίνης, up-regulation του μεταφορέα γλυκόζης Sglt). Η δράση αυτή σηματοδοτεί την λοίμωξη. Δευτερευόντως, σε μιτοχονδριακό επίπεδο, δρα ανασταλτικά στην παραγωγή ATP μειώνοντας τη βιογένεση των μιτοχονδριακών καρδιολιπίνων. Τέλος, αυξάνει το οξυγόνο (O<sub>2</sub>) στο βλεννογόνο του εντέρου, μειώνοντας κατά συνέπεια τα αναερόβια βακτήρια που αποικίζουν φυσιολογικά το κόλον.

Οι Collins et al.,2014<sup>(43)</sup> καταγράφουν τις εξής πλευρές προς μελέτη της σχέσης ξενιστή – παθογόνου που αυτό το ζωικό μοντέλο εντερικής φλεγμονής συμβάλλει :

- Προσφέρεται για μελέτη των φλεγμονώδων εντερικών απαντήσεων κατά την κολίτιδα από το βακτήριο.
- Για αποσαφήνιση των επουλωτικών μηχανισμών του βλεννογόνου και των επιδιορθωτικών μηχανισμών του εντερικού επιθηλίου.



- Ερμηνεία της επαγωγής των ανοσολογικών απαντήσεων του εντερικού βλεννογόνου στη μικροβιακή φλεγμονή.
- Διερεύνηση του ρόλου του μικροβιώματος στη φυσική αντίσταση του εντέρου κατά τον αποικισμό του από εντεροπαθογόνα βακτήρια. Οι Mullineaux-Sanders et al., 2017<sup>(47)</sup> πρόσθεσαν τη μελέτη του ρόλου των commensal bacteria μετά από αντιβιοθεραπεία στην προσβολή από εντεροπαθογόνα.

Οι Buschar et al., 2017<sup>(48)</sup> συμπεραίνουν ότι η προσαρμοστική ανοσολογική απάντηση του ξενιστή και το μικροβίωμα συνεργάζονται για να ελέγξουν την επιθηλιακή λοίμωξη και τον αποικισμό από το συγκεκριμένο παθογόνο. Διαπιστώθηκε ότι αυτό επικουρείται από μια ταχεία «φυσική» (inate), προκαλούμενη από το παθογόνο, βλεννογονική ανοσολογική απάντηση που είναι βασική για να προστατέψει από υπερβολική παθογένεση, πριν η προσαρμοστική ανοσολογική απάντηση λάβει χώρα. Η αποτελεσματικότητά της αποδεικνύεται από το γεγονός ότι, φυσιολογικά, περιορίζει την διάρκεια κατά την οποία τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν επιθηλιακές βλάβες στις πρώτες 18 ώρες της λοίμωξης. Αργότερα, ενδο-αυλικά παθογόνα βακτήρια δεν μπορούν να προκαλέσουν A/E βλάβες. Οι ήδη, όμως, προκληθείσες από τις πρώτες 18 ώρες επιμένουν μέσω τοπικών επιθηλιακών επαναλοιμώξεων. Επομένως, η σοβαρότητα της λοίμωξης στην ακμή της νόσου είναι μορφοποιημένη από τα πρώιμα γεγονότα των πρώτων 18 ωρών.<sup>(47,49,50)</sup>

### 3.2 Κυτταροειδική Γονιδιακή Στόχευση (gene targeting) – Σύστημα Cre-LoxP

Τεχνολογία ανασυνδυασμού γονιδιακού υλικού ( απαλοιφές, εισαγωγές, μεταθέσεις, αναστροφές ), που στοχεύει ειδικές θέσεις στο DNA αποκλειστικά σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων.<sup>(51)</sup>

- **Cre recombinase** (*Cre by “Causes Recombination” or “Cyclization Recombinase”*) : ένζυμο τυροσινικής ανασυνδυάσης ή κυκλική ανασυνδυάση 38kDa, που κωδικοποιείται από βακτηριοφάγο P<sub>1</sub>.
- **LoxP site** ( locus X-over P<sub>1</sub> ) : Παλίνδρομες αλληλουχίες 34 βάσεων, όπου γίνεται το κόψιμο και η ανταλλαγή των αλυσίδων του DNA.

Όταν μια αλληλουχία οριοθετείται από 2 Lox sites αναφέρεται ως “floxed” αλληλουχία. Το ένζυμο Cre ανασυνδυάση (recombinase) ανασυνδυάζει ένα ζεύγος αλληλουχιών LoxP. Η κατάλληλη τοποθέτηση των αλληλουχιών LoxP επιτρέπει σε γονίδια να ενεργοποιούνται, να καταστέλλονται, ή να ανταλλάσσονται με άλλα γονίδια. Η ασύμμετρη “floxed” αλληλουχία ευρίσκεται μεταξύ των δύο Lox sites που εμφανίζουν **προσανατολισμό κατεύθυνσης**

**(directionality).** Η ενζυμική δράση της Cre εξαρτάται από τον προσανατολισμό των Lox sites :

- Η Cre ΑΦΑΙΡΕΙ οποιαδήποτε DNA αλληλουχία μεταξύ δύο lox sites που έχουν την ίδια κατεύθυνση.
- Η Cre ΑΝΑΣΤΡΕΦΕΙ οποιαδήποτε DNA αλληλουχία μεταξύ δύο lox sites που έχουν αντίθετη κατεύθυνση.
- ❖ Κυτταροειδική απενεργοποίηση ενός γονιδίου σε ποντικούς / Conditional knock-out mouse : Το knock-out mouse model αποτελεί τον καλύτερο τρόπο λειτουργικής μελέτης γονιδίων (υγεία, ασθένεια). Μέρος της συγκεκριμένης εργασίας βασίζεται στην πρωτεομική και μετα-πρωτεομική μελέτη γονοτύπων, που προκύπτουν από την αποσιώπηση της έκφρασης της HuR στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και στα μακροφάγα (conditional tissue-specific gene-targeting approach).<sup>(51)</sup>

### 3.3 Πρωτεΐνη HuR και ανοσολογική απάντηση

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ομοιόσταση του εντερικού βλεννογόνου ελέγχεται από **ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RBPs) και μη-κωδικοποιών RNA (ncRNA: non-coding RNA)** που ενορχηστρωμένα δρουν συνεργατικά ή ανταγωνιστικά<sup>(52)</sup>.

Η πρωτεΐνη HuR, κωδικοποιημένη από το ELAVL-1 γονίδιο, αποτελεί μια από τις κορυφαίες ριβονουκλεοπρωτεΐνες που ρυθμίζουν την μεταφραστική διαδικασία και το σχετικό κύκλο εργασιών. Συσχετίζεται με τα **AU – rich elements (AREs)**, σταθεροποιώντας το mRNA (αύξηση του χρόνου ημιζωής).

Τα AU – rich elements (AREs) βρίσκονται στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR : 3'-untranslated region) πολλών mRNA που κωδικοποιούν πρωτοογκογονίδια, κυτοκίνες κτλ. Είναι από τους συχνότερους σταθεροποιητές του mRNA. Η κατευθυνόμενη από AREs αποδόμηση του mRNA διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο τόσο στη διαδικασία κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης, όσο και στην ανοσολογική απάντηση.

Για τη μελέτη της λειτουργίας της HuR έχουν χρησιμοποιηθεί δύο προσεγγίσεις. Αφ' ενός χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια, προκλήθηκε υπερέκφρασή της. Διαπιστώθηκε ότι η HuR στα μακροφάγα ρυθμίζει τη μετάφραση επιλεγμένων φλεγμονωδών mRNAs. Αφ' ετέρου, με **κυτταροειδική απενεργοποίηση της (conditional HuR-knockout-mice)** στα μυελοειδή κύτταρα, υπερακοντίζεται η παραγωγή προ-φλεγμονώδων κυτοκινών και ταυτόχρονα αυξάνει η ευαισθησία σε οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η ενδοτοξιναιμία. Παρόμοια οι Liu et al.,2014<sup>(53)</sup> διαπίστωσαν ότι η έλλειψη της HuR στο εντερικό επηθήλιο μειώνει το

αναγεννητικό δυναμικό του εντερικού βλεννογόνου στο λεπτό έντερο. Οι Giammanco et al.,2014<sup>(54)</sup> συμπέραναν ότι η HuR του εντερικού επιθηλίου ρυθμίζει επίσης μηχανισμούς απόπτωσης μετριάζοντας την ογκογενετική διαδικασία στο έντερο.

## 4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ / ΜΕΤΑ-ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ

### 4.1 Δειγματοληψία

Γενική αρχή αποτελεί ότι τα βιολογικά δείγματα, που συλλέγονται από ανατομικές θέσεις διαχωριστικών μεσεπιφανειών μεταξύ κυτάρων ξενιστή – μικροβιώματος, είναι πολύτιμα στην αποκρυπτογράφηση αυτών των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων. Τέτοια δείγματα είναι : 1) σιέλος και οδοντική πλάκα, 2) η **ενδοαυλική επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου (mucosal-luminal interface\_MLI)**, 3) κόπρανα 4) ορθικό επίχρισμα. Εξ αυτών, η βιβλιογραφία αναδεικνύει τα κόπρανα ως το συνηθέστερο και καταλληλότερο δείγμα.<sup>(55)</sup>

Τα κόπρανα είναι αντιπροσωπευτικά του μικροπεριβάλλοντος τόσο του εγγύς όσο και του άπω εντέρου. Αποτελούν μη - επεμβατική λήψη, καθώς ταυτόχρονα παρέχουν τη δυνατότητα επανειλημμένων λήψεων για χρονική παρακολούθηση του φαινομένου. Ο λόγος ανθρώπινης /μικροβιακής προέλευσης πρωτεϊνών μετά την νεογνική περίοδο ( $\approx 21$  ημέρες) διαμορφώνεται στο 30% έναντι 96% περίπου που είναι αμέσως μετά τη γέννηση. Σε κίρρωτικούς ασθενείς, μάλιστα, έχει παρατηρηθεί συρρίκνωση του σχεδόν στο 10%.

### 4.2 Αποθήκευση – συντήρηση κοπράνων

Οι Choo et al.,2015<sup>(56)</sup> αποφαινόνται ότι οι συνθήκες αποθήκευσης συντήρησης των κοπράνων επηρεάζουν σημαντικά το ανιχνεύσιμο μικροβιακό προφίλ. Ο χρυσός κανόνας συντήρησης είναι η άμεση ψύξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Η συντήρηση σε ψύξη στους  $4^{\circ}\text{C}$  αποτελεί μια ικανοποιητική εναλλακτική πρακτική με επιτρεπόμενο χρόνο παραλαβής του δείγματος από το προσωπικό του εργαστηρίου μεταξύ 24-48 ώρες (shipment time). Αντίθετα, η αποθήκευση σε ατμοσφαιρική θερμοκρασία μετά το πέρας των 48 ωρών αλλάζει δραματικά το μικροβιακό προφίλ του δείγματος . Επιπλέον, η χρήση συντηρητικών, όπως η αιθανόλη, αποκλείεται λόγω του εύφλεκτου κατά τη μεταφορά ή ρυθμιστικών διαλυμάτων με EDTA ή ακόμη εμπορικών kit, όπως το OMNIgene (gut DNA Stabilization kit)

Η αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έχει διάρκεια ασφαλούς συντήρησης έως 2 έτη, σε σύγκριση με τους  $-20^{\circ}\text{C}$  που δεν ξεπερνά τους λίγους μήνες.

Ο μικρός αριθμός πολλαπλών επαναλαμβανόμενων κύκλων ψύξης-απόψυξης είναι βασική προφύλαξη για την αποφυγή αποδόμησης του DNA. Συνιστάται, λοιπόν, μερισματοποίηση του δείγματος.

Οι Wu et al.,2018<sup>(57)</sup> για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων προτείνουν να ταξινομείται το δείγμα κοπράνων σύμφωνα με το Bristol Stool Chart. Στη συνέχεια, αναλόγως τον τύπο (1 μέχρι 7, άκρα δυσκοιλιότητα μέχρι διάρροια) να ακολουθεί ομογενοποίηση, έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η intra-sample διακύμανση. Αντίθετα, οι Santiago et al.,2014<sup>(58)</sup> δεν θεωρούν ότι το υδαρές της κένωσης και η ομογενοποίηση επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση.

Η φάση της **αποθήκευσης του δείγματος (sample storage)** είναι κομβικό στάδιο για την μετα – πρωτεωμική ανάλυση, συχνά παραγνωρισμένο κατά τους Lee et al.,2017<sup>(37)</sup>. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι τα ακέραια κόπρανα είναι πιο σταθερά από τις **κατεψυγμένες εξαχθείσες / εκχυλισμένες πρωτεΐνες (frozen extracted proteins)**.

#### 4.2.1 Χρήση κρυο-προστατευτικών ουσιών <sup>(59)</sup>

Οι MacKain et al.,2013<sup>(60)</sup> συμπεραίνουν ότι η μη-χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών στη συντήρηση των κοπράνων, προκαλεί σημαντική απώλεια των *Bacteroidetes*.

Οι Choo et al.,2015<sup>(56)</sup> μελετώντας διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα συντηρητικών ουσιών (RNA later, OMNIGene-GUT, Tris-EDTA) αποφαινόμενοι ότι το OMNIGene-GUT ρυθμιστικό διάλυμα εμφανίζει τις μικρότερες διαφορές από όλα σε σύγκριση με ξηρά κόπρανα κατεψυγμένα στους -80 °C.

Ασφαλώς, στη διεξαγωγή οποιασδήποτε μελέτης του εντερικού μικροβιώματος πρέπει να εξασφαλίζονται αυστηρά οι ίδιες συνθήκες συντήρησης – αποθήκευσης.

#### 4.3 Προ-επεξεργασία δείγματος (pre-processing of the sample)

Στη βιβλιογραφία εντοπίστηκαν δύο διακριτές στρατηγικές :

1<sup>η</sup>.] Απομόνωση (extraction) πρωτεϊνών δίχως προ-εισαγωγικό στάδιο.

Η στρατηγική της άμεσης από το δείγμα απομόνωσης πρωτεϊνών δίχως ουδεμία διαδικασία εμπλουτισμού επιτρέπει την σύγχρονη εκτίμηση του πρωτεώματος. Προκύπτουν, λοιπόν, αξιοσημείωτες ευκαιρίες μελέτης των σχέσεων ξενιστή – μικροβιώματος τόσο στην υγιή κατάσταση όσο και στην ασθένεια (δυσβίωση, IBD κτλ.). Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να ανιχνεύσουμε πρωτεΐνες επιφανείας μικροβίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις **ενδο – μικροβιακές σχέσεις**, καθώς και στις **σχέσεις με τον ξενιστή (host-microbiome crosstalk)**.<sup>(61)</sup>

Παρά ταύτα, η συντριπτική πλειοψηφία των ανιχνευόμενων πρωτεϊνών, περίπου 90%, είναι μικροβιακής προέλευσης. Οι Kolmeder et al.,2016<sup>(62)</sup>

αναφέρουν ότι οι ανθρώπινες πρωτεΐνες αντιστοιχούν μόνο στο 14% του μετα-πρωτεώματος.

Η άμεση προσέγγιση – μην εμπλέκοντας στάδιο καθαρισμού των βακτηριακών κυττάρων – χαρακτηρίζεται από απλότητα και ταχύτητα, ενώ ταυτόχρονα διαθέτει και τη δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες (large cohort).

2<sup>η</sup>.] Πριν από την απομόνωση των πρωτεϊνών, πραγματοποίηση ενός σταδίου εμπλουτισμού του μικροβιακού φορτίου και μείωσης του υλικού ξενιστή-τροφών.<sup>(63)</sup>

Από την πρωτοποριακή δημοσίευση των Verberkmoes et al.,2009<sup>(64)</sup> χαράχθηκε μια στρατηγική εμπλουτισμού του δείγματος σε μικροβιακό φορτίο, πριν το επόμενο βήμα της απομόνωσης των πρωτεϊνών. Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εμπλουτισμού δείγματος κοπράνων για μελέτη μικροβιώματος είναι η διαφορική φυγοκέντρηση<sup>(63)</sup>. Εναλλακτικά, για τον εμπλουτισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε υπερφυγοκέντρηση<sup>(65)</sup> είτε **διπλό φιλτράρισμα (double filtering, DF)**<sup>(66)</sup>. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με Xiong et al.,2015<sup>(66)</sup> οι μετρήσεις των πολυσύνθετων πρωτεϊνικών μιγμάτων μεροληπτούν υπέρ των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε αφθονία, αποκλείοντας τις συνεκχυλιζόμενες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μικρότερες αναλογίες. Με τη μέθοδο DF παρατηρείται δραματική αύξηση των - σε μικρή αναλογία – πρωτεϊνών, επιτυγχάνοντας έτσι βαθύτερο πρωτεωμικό χαρακτηρισμό, κυρίως μικροβιακής προέλευσης. Επιπλέον, συχνή είναι και η χρήση **μέσων βαθμίδωσης πυκνότητας (density gradient mediums)** επικουρικά με τις μεθόδους φυγοκεντρήσεων.<sup>(67)</sup>

#### Πλεονεκτήματα :

- ✓ Υψηλότερος αριθμός ανιχνεύσεων πεπτιδίων και πρωτεϊνικών ομάδων. Οι Xiong et al.,2015<sup>(66)</sup> αναφέρουν αύξηση μεγαλύτερη του 50%, ενώ οι Tanca et al.,2015<sup>(63)</sup> αναφέρουν ποσοστά της τάξης του 18%.
- ✓ Σημαντικά πλουσιότερη βιοποικιλότητα
- ✓ Επικέντρωση πληροφοριών στο μικροβιακό πρωτέωμα

#### Μειονεκτήματα :

- Δραματική διαφοροποίηση του λόγου *Firmicutes/Bacteroidetes* από 1,2 σε 2. Ο λόγος αυτός έχει συσχετισθεί με ευάριθμες ανοσολογικές (φλεγμονώδης νόσος εντέρου) και μεταβολικές διαταραχές (παχυσαρκία, διαβήτης).
- Μείωση ανίχνευσης σημαντικών λειτουργικών μικροβιακών πρωτεϊνών όπως: α) ένζυμα επιφανείας, β) μεμβρανικές πρωτεΐνες, γ) εξωκυττάρια πρωτεΐνες, δ) μαστίγια (flagelles)

➤ Η στρατηγική, λοιπόν, αυτή προσφέρει αληθινό εμπλουτισμό ή ουσιαστικά λειτουργεί αποψιλώνοντας το δείγμα;<sup>(63)</sup>

❖ ΠΟΙΑ ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΠΙΛΕΓΕΤΑΙ;

Η μέση οδός αποδεικνύεται για ακόμη μια φορά η σοφότερη. Η μέθοδος που θα επιλεγεί πρέπει να έχει σταθμίσει τις ανάγκες του ερευνητικού πρωτοκόλλου κάθε φορά. Εάν ο σκοπός της έρευνας είναι η διερεύνηση λειτουργιών μικροβιακών πρωτεϊνών, τότε η στρατηγική του εμπλουτισμού πιθανά να είναι η πιο προσοδοφόρα. Αντίθετα, σε μελέτες που στοχεύουν στην αποκάλυψη των αλληλεπιδράσεων μικροβιώματος – ξενιστή (host-microbiota crosstalk), η άμεση μέθοδος, χωρίς προδιεργασία, αναδεικνύεται πιο αποτελεσματική.

Ο διατιθέμενος χρόνος και ο όγκος των δειγμάτων αποτελούν επιπρόσθετα κριτήρια στη λήψη καταλληλότερης προσέγγισης.

#### 4.4 Απομόνωση πρωτεϊνών (protein extraction)<sup>(68)</sup>

Οι Lee et al.,2017<sup>(37)</sup> αναφέρουν ότι διαφορετικά πρωτόκολλα μεθοδολογίας απομόνωσης πρωτεϊνών σε περιβαλλοντικά δείγματα αναδεικνύουν διαφορετικές πρωτεϊνικές υποομάδες με ελάχιστη αλληλεπικάλυψη (overlap). Επισημαίνεται, λοιπόν, η σοβαρή επίδραση του σταδίου Protein Extraction στη μετα-πρωτεομική ανάλυση, που μπορεί να εκτρέψει σε λαθεμένα αποτελέσματα.

##### 1) Μηχανική Θραύση :

a. Για τις μελέτες του εντερικού μικροβιώματος, η μηχανική θραύση των μικροβιακών κυττάρων με bead-beating (αλληπάλληλα χτυπήματα σφαιριδίων) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα επαρκής για τα πιο ανθεκτικά σε μηχανική λύση βακτήρια, όπως τα Gram(+) βακτήρια (π.χ. *Firmicutes*, *Actinobacteria*) και τα βακτηριακά ενδοσπόρια<sup>(59)</sup>. Οι Santiago et al.,2014<sup>(58)</sup> υπογραμμίζουν ότι αυτή είναι το κρίσιμο σημείο για την επιτυχή ανίχνευση Gram(+) βακτηρίων.

b. Εναλλακτικά ή/και συμπληρωματικά χρησιμοποιούνται **υπέρηχοι (sonication)**.

2) Θερμική Επεξεργασία : χρησιμοποιείται εκχύλιση με **θερμό υγρό (boiling)**, ταχεία επαναλαμβανόμενη **ψύξη-απόψυξη (freeze-thawing)**, **θραύση με απότομη ψύξη (snap-freezing)**

3) Ρυθμιστικά Διαλύματα : Είτε αυτούσιο PBS (phosphate buffer saline), το οποίο μιμείται υγρά σώματος, είτε PBS στο οποίο περιέχονται:

- i. Απορρυπαντικά (SDS, CHAPS, Triton X-100)\_ εδώ έχουμε μετουσίωση πρωτεϊνών δρώντας στις εσωτερικές υδρόφοβες ομάδες τους
- ii. Χαοτροπικές ουσίες (ουρία, υδροχλωρική γουανιδίνη)\_εδώ έχουμε μετουσίωση πρωτεϊνών αποδυναμώνοντας τους δεσμούς υδρογόνου.
- iii. Αναγωγικές ουσίες (dithithreitol DTT, tributylphosphine)
- iv. Διάφορες οργανικές ή ανόργανες ουσίες (φαινόλη, NaOH)

Οι Kolmeder et al.,2012<sup>(61)</sup> χρησιμοποιούν 6 αλληλοδιάδοχους κύκλους με μεσοδιαστήματα των 5min bead-beating. Οι Tanca et al.,2014<sup>(68)</sup> αφού θερμάνουν το δείγμα, το υποβάλλουν σε συνδυασμό bead-beating και freeze-thawing. Οι Moon et al.,2018<sup>(69)</sup> χρησιμοποιούν sonication στους 4°C για 10min και **ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer)** (μαζί με αναστολέα πρωτεάσης). Οι Xiong et al.,2015<sup>(66)</sup> χρησιμοποιούν βρασμένο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer: SDS,DTT,TrisHCl) και υπερήχους (sonication).

Οι McNulty et al.,2013<sup>(70)</sup> χρησιμοποιούν σε δείγματα κοπράνων ποντικών υπερήχους σε συνδυασμό με SDS 4% w/v και θέρμανση στους 95°C.

Οι Zhang et al.,2016<sup>(38)</sup> σε δείγματα ποντικών και ανθρώπων χρησιμοποιούν συνδυαστικά υπερήχους με λυτικό διάλυμα SDS/ουρία.

❖ Τα πρωτόκολλα απομόνωσης πρωτεϊνών πάσχουν από σταθερότητα αποτελεσμάτων, από έρευνα σε έρευνα, και το κυριότερο δεν υπάρχει συστηματική αξιολόγηση των επιπτώσεων διαφορετικών μεθοδολογιών στα παραγόμενα αποτελέσματα.

❖ Αξιολόγηση από μια канаδική ερευνητική ομάδα<sup>(12)</sup> των διαφόρων μεθόδων συνοψίζουν τα συμπεράσματά τους :

- i. Τα ρυθμιστικά με απορρυπαντικό SDS αποδίδουν καλύτερα
- ii. Οι μέθοδοι μηχανικής θραύσης είναι καθοριστικοί
- iii. Οι χρήση υπερήχων αποτελεί ικανοποιητική εναλλακτική του bead-beating αποδίδοντας πλουσιότερη παραγωγή πρωτεϊνών

❖ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΛΥΣΗΣ



- Τα λυτικά διαλύματα διαφέρουν στην οριακή συγκέντρωση μικυλλίων (**critical micelle concentration CMC**). Αυτή ορίζεται ως η συγκέντρωση κατά την οποία σχηματίζονται από το απορρυπαντικό αυτόματα μικύλλια. Η αποτελεσματικότητα και η ικανότητα απομάκρυνσης του απορρυπαντικού καθορίζονται από αυτή. Τιμές υψηλότερες σε mM σχετίζονται με ασθενέστερη υδρόφοβη σύνδεση και ευκολότερη απομάκρυνση του απορρυπαντικού. Επομένως, χαμηλό CMC σηματοδοτεί μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.
- Μια άλλη παράμετρος της δραστηριότητας λυτικών διαλυμάτων είναι το **μοριακό βάρος μικυλλίων (micelle molecular weight MMW)**. Χαμηλό MMW σημαίνει ότι είναι ευκολότερο να απομακρυνθούν.

Η συνδυαστική χρήση CMC και MMW οδηγεί στη βέλτιστη για το πείραμα επιλογή. Εξαιρετικά σημαντικό είναι να υπογραμμισθεί ότι στην πλειονότητα τους τα απορρυπαντικά είναι ασύμβατα με MS και ESI. Αυτό ισχύει σε μέγιστο βαθμό για το SDS. Επομένως για να ακολουθήσει μετα-πρωτεωμική ανάλυση πρέπει να απομακρυνθούν. Η επεξεργασία με θρυψίνη των πρωτεϊνών πριν το MS δεν επηρεάζει τόσο ειδικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις π.χ. <0,1% για SDS.

Επιλέγουμε, συνεπώς, απορρυπαντικό με χαμηλό CMC και χαμηλό MMW και κυρίως ακολουθούμε τη χρυσή αρχή fit-for-purpose, όπως δείχνει ο Tanca et al., συγκρίνοντας SDS και RapiGest, όπου σε όλα υπερτερεί το SDS, με εξαίρεση την υπεροχή του RapiGest σε απομονώσεις περιπλασματικών πρωτεϊνών σε πρωτεωμική μελέτη της *E.coli*.

#### 4.5 Πέψη πρωτεϊνών<sup>(71–78)</sup>

Στο στάδιο αυτό του χειρισμού του δείγματος έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές προσεγγίσεις που ικανοποιούν διαφοροποιημένες αναζητήσεις ερευνητικών ομάδων και παρουσιάζουν αντίστοιχα πλεονεκτήματα και αδυναμίες. Από αυτές σταχυολογούμε τις εξής : 1) In-solution digestion, 2) In-gel digestion, 3) on-filter digestion (FASP και MED-FASP), 4) on-pellet digestion

1) In-solution digestion (ISD) : Σύμφωνα με αυτή έχουμε μετουσίωση, αναγωγή, αλκυλίωση και πέψη του πρωτεϊνικού δείγματος σε υγρή φάση. Η τεχνική αυτή είναι εξαιρετικά δημοφιλής και έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρύ φάσμα υλικών.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου : α) απλή, β) η πραγματοποίησή της με single-tube approach απαιτεί μικρότερο ποσό πρωτεΐνης και έτσι ελαχιστοποιεί την απώλεια υλικού από περιέκτη σε περιέκτη, γ) λόγω των μικρότερων απαιτήσεων σε ποσό πρωτεΐνης, έχουμε την πολυτέλεια να απωλέσουμε

ποσότητα κατά την απομάκρυνση των ρύπων (contaminants), δ) η συγκέντρωση πρωτεΐνης μπορεί χονδροειδώς να ελεγχθεί.

2) In-gel digestion (IGD) : Με βάση αυτή, ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πήκτωμα (gel) προηγείται της πρωτεϊνικής πέψης. Η λειτουργία της τεχνικής αυτής εκπροσωπείται με την SDS-PAGE (1 διάστασης διαχωρισμός), όπου στο πήκτωμα έχει ενσωματωθεί το ανιονικό απορρυπαντικό SDS το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες ενώ παράλληλα τις φορτίζει αρνητικά. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων ( 2-D-electrophoresis) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, επιτυγχάνοντας αύξηση της **εκλεκτικότητας (selectivity)**.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου : α) γρήγορη, β) ευαίσθητη, γ) μεγάλη διαχωριστική ικανότητα με την κλασματοποίηση (pre-fractionation) του δείγματος (πολύτιμο σε πολύπλοκα δείγματα), δ) χαμηλό κόστος. Ακόμη και αν χρησιμοποιηθεί η κοστοβόρα 2D-electrophoresis το κόστος που εξοικονομείται από την μείωση του χρόνου για MS (λόγω καλύτερου διαχωρισμού), είναι μεγαλύτερο. Εξαιρετικά σημαντική αναδείχθηκε η επινόηση, στο in gel digestion protocol, από τους Shevchenko et al., 1996<sup>(79)</sup> να αντικαταστήσουν την χρωστική Coomassie Blue με Silver staining, πολλαπλασιάζοντας την ευαισθησία της μεθόδου 10-100 φορές. Πέτυχε, έτσι, τα παραγόμενα πεπτίδια να είναι αρκετά «καθαρά», ώστε να μην «δηλητηριάζουν» το electro-spray ή το φασματομέτρο μάζας.<sup>(80)</sup>

#### ❖ ISD vs IGD :

- Η απομόνωση των πεπτιδίων από την “in solution” είναι εκ φύσεως περισσότερο αποτελεσματική από την “in gel” (ποσοστό 70-80 %).
- Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στην ISD ελέγχεται πολύ ακριβέστερα από ότι στην IGD.
- Η IGD είναι αρκετά ταχύτερη από την ISD.
- Η IGD είναι λιγότερο κοστοβόρα από την ISD.

3) On-filter Digestion (FASP και MED-FASP)<sup>(71-75)</sup> : Οι πρόοδοι στην ISD και IGD συνδυάστηκαν αρχικά από τον Manza et al.(2005)<sup>(71)</sup> στην υποβοηθούμενη από **φίλτρα περιστροφής (spin-filter)** πέψη πρωτεϊνών. Οι Wisniewski et al.,<sup>(74,75)</sup> εφηύβραν το ακρωνύμιο **FASP : Filter-Aided Sample Preparation. Επίσης πρότειναν<sup>(72)</sup> το MED-FASP (Multiple Enzyme Digestion-FASP).**

Στη FASP οι πρωτεΐνες παγιδεύονται σε ένα φίλτρο με ηθμούς υψηλού μοριακού βάρους, ενώ τα άλατα και ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους

απορρίπτονται. Χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας επιτυγχάνεται η ολοκληρωτική απομάκρυνση ( $\geq 99,9\%$ ) του SDS από το δείγμα. Μετά από καρβιδομεθυλίωση των πρωτεϊνών προστίθεται θρυψίνη κατευθείαν στο φίλτρο. Ακολουθεί έκλυση με αναγκαίους όγκους ρυθμιστικού. Κύριο χαρακτηριστικό της FASP αποτελεί η αποτελεσματική απομάκρυνση των απορρυπαντικών και ρύπων από το δείγμα.

Στη MED-FASP έχουμε την ίδια διαδικασία αλληλοδιάδοχα επαναλαμβανόμενη με δύο ή τρία ένζυμα (endoproteinases LyC, trypsin).

Πλεονεκτήματα FASP : 1<sup>ov</sup>) Είναι single-tube protocol , 2<sup>ov</sup>) Αποτελεσματική απομάκρυνση απορρυπαντικών-ρύπων.

4) On-pellet Digestion (OPD) : Αν και είναι σχεδόν πανομοιότυπη με την ISD, παρουσιάζει μικρές ιδιαιτεριότητες σε σχέση με αυτή. Αρχικά, χρησιμοποιείται SDS/urea για αρχική απομόνωση πρωτεϊνών. Έπειτα, αντί ολονύκτιας επώασης με θρυψίνη χρησιμοποιείται πριν την αναγωγή και αλκυλίωση ένα προ-στάδιο (pre-trypsination) επί 4h σε 37°C. Στη συνέχεια, την αναγωγή-αλκυλίωση ακολουθεί η ολονύκτια επώαση με θρυψίνη. Παρατηρείται ότι παρουσιάζει, όπως και η ISD, παρόμοια πλεονεκτήματα απλότητας και μεγάλης απόδοσης. Τέλος, στη μεταξύ τους σύγκριση με την ISD, υστερεί μόνο όσον αφορά στην απώλεια πρωτεϊνών σε δείγματα από κάποιους ιστούς.

#### Μέθοδος προς ανάπτυξη : **SP3\_Single-Pot Solid-Phase Sample-Preparation**<sup>(81-84)</sup>

Αρχή της Μεθόδου : Στηρίζεται στην παγίδευση πεπτιδίων και πρωτεϊνών στην υδρόφιλη επιφάνεια μαγνητικών σφαιριδίων. Η μέθοδος προσφέρει μη-επιλεκτική σύνδεση των πρωτεϊνών. Η αφυδάτωση του πρωτεϊνικού διαλύματος (50% ακετονιτρίλιο, 1% φορμικό οξύ) προκαλεί την καθίζηση των πολυπεπτιδικών συσσωματωμάτων στην επιφάνεια των σφαιριδίων. Στη συνέχεια η έκπλυση με οργανικό διαλύτη (απρωτικό ή πρωτικό) ή διάλυμα άλατος απομακρύνει τα μη-πολυπεπτιδικά στοιχεία από τις καθηλωμένες στα μαγνητικά σφαιρίδια πρωτεΐνες. Αυτές πέπτονται σε υδατικό διάλυμα Trypsin/Lys-C , εκλυόμενες από τα σφαιρίδια. Η ανάκτηση των πρωτεϊνών βελτιστοποιείται με χρήση υπερήχων πριν και ειδικά μετά την προσθήκη του πεπτιδικού υδατικού διαλύματος.

#### **4.5.1 Συγκριτική αξιολόγηση διαφόρων μεθοδολογιών πέψης πρωτεϊνών**

Οι Klont et al.,2018<sup>(76)</sup> αξιολογούν με βάση τα εξής κριτήρια :

- i. Τις σχετικές απώλειες πεπτιδίων και πρωτεϊνών.
- ii. Την ακρίβεια ποσοτικού προσδιορισμού πεπτιδίων και πρωτεϊνών.
- iii. Την ικανότητα ανίχνευσης – ευαισθησία ποιοτικού προσδιορισμού
- iv. Σύγκριση των κατανομών πεπτιδίων – πρωτεϊνών με βάση επιλεγμένα χαρακτηριστικά (μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο, υδροφοβικότητα).

Επισημαίνουν, λοιπόν, τις εξής παρατηρήσεις :

- Οι μέγιστες απώλειες παρατηρήθηκαν στην IGD με ποσοστά της τάξης 27-40 % , αναλόγως τον ιστό (δείγμα), σε σχέση με την ISD (100%).
- Όλες οι μέθοδοι παρουσιάζουν παραπλήσια ακρίβεια.
- Ο μέγιστος αριθμός πεπτιδίων ανιχνεύθηκε με ISD και OPD, με 10-20% λιγότερο αριθμό στις IGD και OFD.
- Οι κατανομές των πρωτεϊνών με βάση τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά είναι μάλλον παρόμοιες. Μόνο για IGD, η κατανομή με βάση το μοριακό βάρος μετατοπίζεται προς μεγαλύτερες πρωτεΐνες, ενώ των όξινων πρωτεϊνών (pH±5) μοιάζει να είναι χαμηλότερη από ότι σε άλλες μεθόδους.

Συμπερασματικά, καταλήγουν ότι, η επιλογή της εκάστοτε μεθόδου πρέπει να καθορίζεται από την αρχή της «ταιριαστής για την περίπτωση» (“fit-for-purpose”) εκτίμησης.

Τέλος, παραθέτουμε τις συγκρίσεις του Wisniewski<sup>(72)</sup>, ενός εκ των ερευνητών του MED-FASP, για τις μεθόδους ISD και FASP. Ισχυρίζεται, λοιπόν, ότι η FASP απομονώνει 1,5 με 2 φορές περισσότερα πεπτίδια από την ISD. Εκτιμώντας την επάρκεια ρήξης των πεπτιδικών δεσμών (μετρά ποσοστό **μερικώς διασπασμένων πεπτιδίων, partially cleaved peptides\_MCPs**), βρίσκει υψηλότερο ποσοστό MCPs στην ISD( λόγω **ασθενέστερης απόδοσης διάσπασης\_ weaker cleavage efficiency**), που το αποδίδει στο γεγονός ότι στη FASP χρησιμοποιείται ελάχιστα ουρία ή και καθόλου. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η FASP ξεπερνά σε επιδόσεις την ISD. Εν κατακλείδι, παρουσιάζει δεδομένα που αφορούν στην επαναληψιμότητα της μεθόδου του, τα οποία εγείρουν ενστάσεις από άλλους ερευνητές, που έρχονται να τα αντικρούσουν.

#### 4.6 Εφαρμογές τεχνικών προετοιμασίας δείγματος κοπράνων για μετα-πρωτεωμική ανάλυση φασματομετρίας μάζας

Οι Verberkmoes et al.,2009<sup>(64)</sup> στην πρωτοποριακή μελέτη τους χρησιμοποίησαν διαφορεική φυγοκέντρηση για απομόνωση των κυττάρων. Εν

συνεχεία, με διαδικασία single-tube-cell-lysis χρησιμοποιώντας διάλυμα γουανιδίνης (GuHCl) / διθειοθριόλης (DTT) πέτυχαν μετουσίωση και αναγωγή των πρωτεϊνών. Ακολούθησε πέψη τους με θρυψίνη.

Οι Kolmeder et al.,2012<sup>(61)</sup> μετά από μηχανική θραύση ακολουθούν πρωτόκολλο in-gel digestion με 1D – SDS-PAGE.

Οι Tanca et al.,2013<sup>(85)</sup> και Wu et al.,2017<sup>(65)</sup> μετά από διάφορα πρωτόκολλα πρωτεϊνικής απομόνωσης ακολούθησαν on-filter digestion (FASP και MED-FASP).

Οι X.Zhang et al.,2017<sup>(78)</sup> ακολούθησαν in-solution digestion (ISD).

#### **4.7 Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης / Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)<sup>(86–89)</sup>**

Η HPLC έχει αποδείξει περισσότερο από 40 χρόνια την αναλυτική της αξία. Η υπερ-υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (UHPLC) προέκυψε ως βελτίωση της HPLC εισάγοντας τη χρήση εξαιρετικά μικρότερων πόρων, διαμέτρου της  $\leq 2\mu\text{m}$  έναντι των  $\geq 5\mu\text{m}$ . Σύμφωνα με την εξίσωση του van Deemter, με τη μείωση της διαμέτρου σε αυτά τα επίπεδα προκύπτει σημαντικό κέρδος στην αποτελεσματικότητα διαχωρισμού, δίχως όμως να ελαττώνεται και η ταχύτητα ροής. Το τίμημα είναι ότι απαιτούνται πολλαπλάσιες πιέσεις συγκριτικά με την HPLC, της τάξης των 100.000psi έναντι των 6.000psi. Η UHPLC πλεονεκτεί, διότι :

- ✓ Ενισχύει την διακριτική ικανότητα της μεθόδου.
- ✓ Αυξάνει την ταχύτητά της.
- ✓ Επιτυγχάνει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για ίδιο μήκος στήλης.

Η UHPLC είναι μια χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Η στατική φάση είναι λιγότερο πολική ή καθόλου σε σχέση με την κινητή φάση. Ως στατική φάση χρησιμοποιούνται πηκτή πυριτίας (ODS) ή στήλες C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, X<sub>3</sub> (χημικά τροποποιημένη πυριτία). Η C<sub>18</sub> στήλη, για παράδειγμα, περιέχει σωματίδια πυριτίου (silica) συνδεδεμένα με καρβονικές ομάδες μήκους 18 ατόμων. Αυτού του τύπου η φάση είναι υδρόφοβη και μη-πολικά μόρια αντιδρούν με αυτήν διερχόμενα από τη στήλη. Επομένως, όταν υπάρχουν στο δείγμα δύο συστατικά με διαφορετικές υδροφοβικές ιδιότητες, το λιγότερο υδροφοβικό συστατικό εκλούεται πρώτο. Η κινητή φάση βοηθά να κινηθούν αυτά τα μόρια κατά μήκος και έξω από τη στήλη. Η κινητή φάση, διαθέτοντας ένα ισχυρό διαλυτικό περιεχόμενο, συγκρατεί τα μόρια προς απομάκρυνση. Από διαλύτες, σύμφωνα με τη σχετική τιμή έκλουσης, χρησιμοποιούνται ασθενείς όπως το ακετονιτρίλιο (ACN) ή οξικός αιθυλεστέρας.

Στην πρωτεωμική ανάλυση αξιοποιούνται οι ιδιότητες προσθετικών ουσιών, που χαρακτηρίζονται ως ion-pairing agents, όπως το φορμικό οξύ ή το τριφθοροαιθανικό οξύ (ή τριφθοροξικό οξύ\_Tri Fluoro Aceti acid\_TFA), τα οποία συμπεριλαμβάνονται στα διαλύματα έκλουσης (κινητή φάση). Εξ αυτών υπερέχει το φορμικό οξύ ως ion-pairing agent. Παρουσιάζει υψηλή συμβατότητα με MS, διότι ελαχιστοποιεί το «φαινόμενο καταστολής ιόντων» (*ion-suppression effect*) στην ESI/MS. Προτείνονται διάφοροι μηχανισμοί ερμηνείας της δράσης των ion-pairing agents. Το φορμικό οξύ, για παράδειγμα, διαθέτει ένα μη-πολικό άκρο που συγκρατείται από την μη-πολική στατική φάση. Αφήνοντας το πολικό άκρο ελεύθερο εντός της κινητής φάσης. Το πολικό άκρο, λειτουργώντας σαν «*χρωματογραφικό σαπούνι*» έλκει τα ιοντικά φορτία αντίθετης φόρτισης της κινητής φάσης, προσφέροντας χρωματογραφική κατακράτηση.<sup>(90)</sup>

#### 4.7.1 Διασύνδεση συστημάτων υγρής χρωματογραφίας με φασματόμετρο μαζών<sup>(86–89)</sup>

Η σύζευξη αυτή εφαρμόζεται στην πλειοψηφία των βιολογικά δραστικών ενώσεων (μη-πτητικές, θερμοευαίσθητες). Οι δύο αυτές τεχνικές είναι ασύμβατες μεταξύ τους, λόγω των μεγάλων όγκων διαλυτών στην LC και του απαιτούμενου κενού στην MS. Επομένως, απαιτείται η χρήση **διάταξης σύζευξης (interface)**. Σήμερα, η συχνότερα χρησιμοποιούμενη σύζευξη είναι ο **ψεκασμός σε δυναμικό (electrospray)**.

Με το electrospray παράγεται ένα λεπτό εκνέφωμα φορτισμένων σταγονιδίων υπό την επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Η εξάτμιση του διαλύτη μετατρέπει τα φορτισμένα σταγονίδια σε ιόντα αέριας φάσης. Πλεονεκτήματα αυτού :

1. Προσφέρει την πιο επιτυχημένη διασύνδεση για εφαρμογές LC/MS.
2. Ίδανική για μετρήσεις βιομορίων με μοριακό βάρος  $\geq 100.000\text{Da}$
3. Επειδή τα παραγόμενα ιόντα είναι πολυσθενή (τιμές  $m/z$  αρκετά μικρές) ανιχνεύονται εύκολα με τετραπολικά όργανα (κάλυψη περιοχών  $MB \leq 1.500$ ). Σημαντικό χαρακτηριστικό των φασμάτων πρωτεϊνών είναι ότι το μέσο φορτίο αυξάνει περίπου γραμμικά με το μοριακό βάρος. Το φορτίο που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή προσδιορίζεται από την κατανομή των κορυφών, οπότε είναι δυνατός και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης από τέτοιου είδους φάσματα.

Η ζεύξη LC-MS παρά τις ασυμβατότητες προσφέρει κέρδη σε αμφότερους τους συμβαλλόμενους. Έτσι, όσον αφορά στην χρωματογραφική ανάλυση που ο στόχος της είναι ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος, έχουμε : α) μεγάλη ευαισθησία, β) υψηλή εκλεκτικότητα (απόλυτη ταυτοποίηση) ακόμη και αγνώστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα και γ) εφαρμογή ενός

**ολικού ανιχνευτή (universal detector).** Από την άλλη μεριά, η φασματομετρία μάζας κερδίζει σε : α) αποφυγή ανάγκης τροποποίησης του μορίου της προσδιοριζόμενης ουσίας (άμεση εισαγωγή), β) αξιοποίηση της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας της LC και γ) περιορισμό ανεπιθύμητων φαινομένων (π.χ. μετριασμός της επίδρασης του υποστρώματος στην απόδοση ιοντισμού)

Αντιθέτως, αν μειονέκτημα της φασματομετρίας μαζών μπορεί να θεωρηθεί το συγκριτικά μεγάλο κόστος των απαιτούμενων οργάνων, το υψηλό λειτουργικό κόστος και ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης του χρήστη (χειρισμός-ερμηνεία) , τότε για τα διασυνδεδεμένα συστήματα ισχύουν πολύ περισσότερο.

#### **4.8 Φασματομετρία μάζας πρωτεϊνών<sup>(86-89)</sup>**

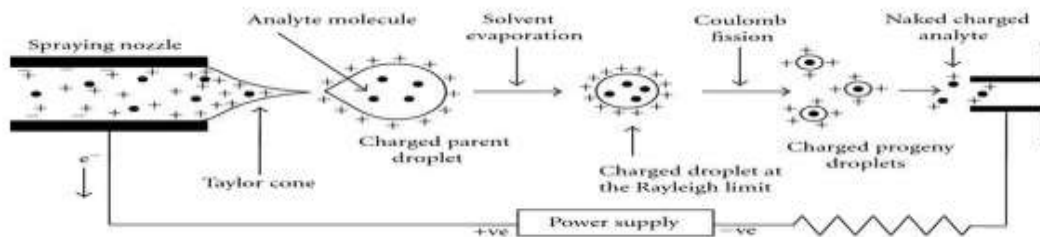
ΟΡΙΣΜΟΣ: Τεχνικές προσδιορισμού δομής και ποσοτικοποίησης οι οποίες υπολογίζουν το λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) ατόμων ή μορίων, καταγράφοντας τη σχετική ένταση ιοντικού ρεύματος.

Διάταξη ανάλυσης τυπικού φασματογράφου μαζών:

- 1) Το σύστημα εισαγωγής δείγματος: συνήθως σε αραιή ή υγρή μορφή
- 2) Σύσκεψη παραγωγής ιόντων όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα.
- 3) Αναλυτής μαζών: Διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο  $m/z$ . Αξιολόγηση με βάση τη διαχωριστική του ικανότητα (resolution)
- 4) Τον ανιχνευτή: Τα διαχωριζόμενα ιόντα συλλαμβάνονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα.
- 5) Το σύστημα κενού: Αντλίες κενού (εσωτερικές-εξωτερικές) διατηρούν το φασματογράφο υπό κενό.
- 6) Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή: Με το κατάλληλο λογισμικό

##### **4.8.1 Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό / Electro-Spray Ionization (ESI)<sup>(86-89)</sup>**

**Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)** χαρακτηρίζεται ως soft ionization τεχνική και άλλαξε ραγδαία την πρωτεωμική ανάλυση με MS.



Σχήμα 4.1: Απεικόνιση του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό

#### Πλεονεκτήματα ESI :

- ✓ Δεν αντιμετωπίζει περιορισμούς σχετικά με το μοριακό βάρος στην ανάλυση
- ✓ Υπερέχει όσον αφορά στον ταυτόχρονο ιονισμό μετρίως πολικών και πολικών μορίων
- ✓ Καλή ευαισθησία, εύκολη ποσοτικοποίηση
- ✓ Συνδυάζεται με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis) και υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC) – προσδιορισμός βιομορίων μεγάλου εύρους μαζών

#### Μειονεκτήματα ESI :

- Απαραίτητα χαμηλή ροή κινητής φάσης
- Απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα και ανταγωνιστική μήτρα
- Σχηματισμός **ιόντων προσθήκης (adduct ions)**

#### 4.8.2 Αναλυτές μαζών<sup>(86-89)</sup>

Επιτυγχάνουν να διαχωρίζουν ιόντα με βάση το **λόγο μάζα-προς-φορτίο (m/z)**. Το καταγραφόμενο ιοντικό ρεύμα οφείλεται σε ένα μόνο m/z κάθε στιγμή. Αξιολογούνται με βάση τη **διαχωριστική τους ικανότητα (Resolution,  $R=m/\Delta M$ )**, σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Με τα φασματόμετρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ( $R=10^4-10^5$ ) μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα, αλλά με διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας (exact mass), που διαφέρουν στο τρίτο ή τέταρτο δεκαδικό ψηφίο. Διακρίνονται με βάση την παραγωγή ιόντων στην πηγή ιόντων σε :

- 1) Συνεχείς Αναλυτές Μαζών (αδιάκοπη παραγωγή ιόντων)
  - a. Τετραπολικοί αναλυτές μαζών (Quadrupole Mass Analyzers)
  - b. Αναλυτές μαγνητικού τομέα (Magnetic Sector)



- 2) Παλμικοί Αναλυτές Μαζών (παραγωγή ιόντων κατά ώσεις)
  - a. Τετραπολική παγίδα ιόντων (Ion Trap, IT)
  - b. Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)
  - c. Αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR) – Υβριδικός Αναλυτής Orbitrap

Τα Τετράπολα και οι Παγίδες Ιόντων είναι όργανα χαμηλής διακριτικής ικανότητας, ενώ τα TOF, Μαγνητικοί αναλυτές και FTICR είναι υψηλής. Ειδικά οι FTICR εμφανίζουν την υψηλότερη διακριτική ικανότητα με  $R > 10^6$ .

#### 4.8.3 Πρόσθετες μονάδες διατάξεων φασματομέτρων μαζών<sup>(86–89)</sup>

- 1) Συστήματα Παραγωγής Κενού : όπου, η προαπαιτούμενη επαρκής ποσότητα ατμών, για τη λήψη του φάσματος, επιτυγχάνεται με συνεχή παραγωγή υψηλού κενού στο εύρος των  $10^{-6}$  έως  $10^{-7}$  Torr με συνδυασμό αντλιών ή στροβιλομοριακές αντλίες (δίχως υγρά).
- 2) Όργανα Παρουσιάσεως-Καταγραφής Φάσματος Μαζών : Το σήμα από τον ανιχνευτή ψηφιοποιείται και καταχωρείται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την :
  - a. Ταχύτατη βαθμονόμηση του φασματομέτρου
  - b. Ταυτοποίηση των ιοντικών θραυσμάτων από την ακριβή τιμή  $m/z$  ή τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών σε περιπτώσεις, συνηθέστερα, μείγματος δύο ή περισσότερων ισοτόπων (ισοτοπική αφθονία).
  - c. ΚΥΡΙΩΣ : Με την εφαρμογή κατάλληλου **λογισμικού (software)** μπορούμε να έχουμε ταυτοποίηση φασματικών δεδομένων.

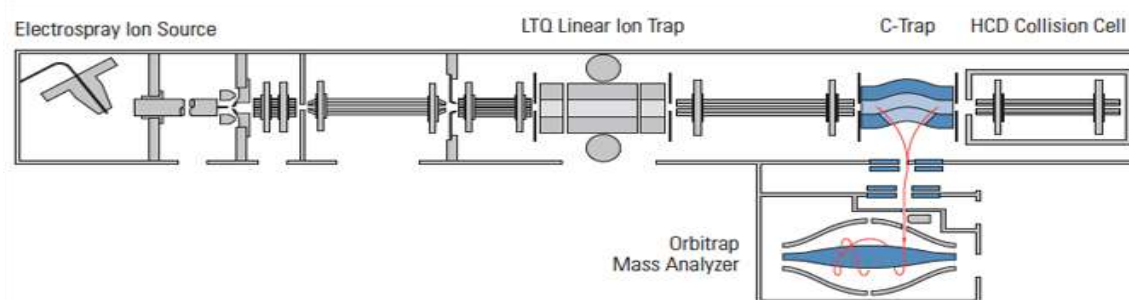
#### 4.9 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap<sup>(86–89)</sup>

Τα ιόντα από την πηγή αποθηκεύονται σε ιοντική παγίδα και σταδιακά στο Orbitrap. Τα ιόντα σταθεροποιούνται σε κυκλικές τροχιές γύρω από το αξονικό ηλεκτρόδιο.

Χαρακτηριστικά:

- Υψηλότερη διακριτική ικανότητα  $R=100K$  έως  $240K$  στα  $m/z$  400
- Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών ( $< 1\text{ppm}$ )
- Μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιοντικές παγίδες
- Μη-καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων

- Ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων (ιδανικό για –omics αναλύσεις)
- Δυνατότητα MS/MS, σε συνδυασμό με ιοντική παγίδα (πάντα MS/MS στην πρωτεωμική)
- Προσδιορίζει από μικρά μόρια μέχρι μεγαλομόρια.
- Ακριβό όργανο και πολύπλοκη λειτουργία
- Σχετικά γρήγορη σάρωση με 30-40Hz
- Απαιτήση υψηλού κενού της τάξης των  $10^{-10}$ Torr



**Σχήμα 4.2:** Απεικόνιση του υβριδικού αναλυτή Orbitrap

## 5 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup> ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ

### 5.1 Πληροφοριακά εργαλεία για ποιοτική και ποσοτική επεξεργασία πρωτεϊνικών δεδομένων LC-MS από δείγματα με μεθόδους δίχως σήμανση

Οι Karpievitch et al.,2012<sup>(91)</sup> προτείνουν η διαδικασία της επεξεργασίας αποτελεσμάτων (**data processing : pre-processing + downstream inference**) να κωδικοποιηθεί σε ένα στατιστικό μοντέλο όπως :

**Δεδομένα = Τεχνικό σήμα + Βιολογικό σήμα + Τυχαίο σφάλμα**

**(Data = Technical signal + Biological signal + Random error)**

όπου, το τεχνικό σφάλμα αναπαριστά οποιοδήποτε συστηματικό σφάλμα (bias) και το βιολογικό σήμα αναπαριστά συστηματικές βιολογικές διαφορές μεταξύ των ομάδων προς σύγκριση.

Στην πράξη η τυπική “*analysis pipeline*” περιλαμβάνει δύο διαδοχικά βήματα

1<sup>ov</sup>) Data = Technical signal + Random error

2<sup>ov</sup>) Residuals = Biological signal + Random error

όπου, Residuals είναι τα επεξεργασμένα-κανονικοποιημένα (normalized) δεδομένα.

#### 5.1.1 Συστηματικά σφάλματα<sup>(92)</sup>

Η πληροφορική ανάλυση πρωτεωμικών δεδομένων περιλαμβάνει τρία επίπεδα:

- 1) Επεξεργασία των **σημάτων (signals)** από τα **ακατέργαστα δεδομένα (raw data)**.
  - a. Φιλτράρισμα
  - b. Κεντροποίηση
  - c. Εκτίμηση φορτίου
- 2) Διαδικασία ποσοτικοποίησης.
- 3) **Ευθυγράμμιση χαρτών (Map Alignment)** και **κανονικοποίηση (normalization)**.

**1<sup>ο</sup> επίπεδο : Επεξεργασία ακατέργαστων δεδομένων**

**a. Φιλτράρισμα (filtering)** : Ποια η αναγκαιότητά του στην υπολογιστική (computational) φασματομετρία μάζας;

Η ανάλυση ενός τυπικού σήματος στη φασματομετρία μάζας μπορεί να αποσυναρμολογηθεί σε τρία συνθετικά μέρη με διαφορετικές εμβέλειες συχνότητας.

- Την **Πληροφορία (Information)** : αυτό είναι το «πραγματικό» σήμα για το οποίο ενδιαφερόμαστε, π.χ. ένα ισοτοπικό **μοτίβο (pattern)** προκαλούμενο από ένα πεππίδιο. Αυτή έχει **μέση συχνότητα (medium frequency)**.
- Την **Βασική Γραμμή (Baseline)** : μια ευρεία τάση, για παράδειγμα, προκαλούμενη από σήματα των ιόντων της μήτρας (matrix), όταν χρησιμοποιείται MALDI. Αυτή εμφανίζει **πολύ χαμηλή συχνότητα (very low frequency)**.
- Το **Θόρυβο (Noise)** : για παράδειγμα, ο θόρυβος ελπίζουμε να μην συσχετίζεται μεταξύ διαδοχικών σημείων δειγμάτων στα ακατέργαστα δείγματα.

➤ Πώς παρεμβαίνουν στη μορφολογία του σήματος παραμορφώνοντας την πληροφορία:

- Η Βασική Γραμμή (baseline) στα φάσματα της MALDI και σε κάποια έκταση στα φάσματα της ESI γίνεται εμφανής ως προσθήκη του σήματος του αναλυτή. Στα φάσματα της MALDI μπορεί να κυριαρχήσει στις χαμηλές m/z περιοχές και να εξαφανιστεί όσο αυξάνει το m/z. Τυπικά μορφοποιείται σαν **εκθετική φθίνουσα κατανομή (exponential decay)**. Οδηγεί σε φτωχή ανάλυση του σχήματος της **κορυφής (peak)**. Εμπλέκεται, λοιπόν, με την **εκτίμηση της έντασης (intensity estimation)** και πρέπει να απομακρυνθεί. Το top-hat filter (Fourier space filtering techniques) είναι ένα **μορφολογικό φίλτρο (morphological filter)** που μπορεί να χρησιμοποιηθεί.
- Ο **Θόρυβος (noise)** : Κάθε φασματομέτρο μάζας υποφέρει από υψηλής συχνότητας θόρυβο (ηλεκτρονικό λόγω ανιχνευτή, χημικό λόγω lysis, buffers, contaminants). Κορυφές που αναμένονταν να εμφανίζονται περίπου σχήμα Gaussian κατανομής μπορεί να μην εμφανίζονται πλέον κυρτές. Αυτό είναι, ιδιαίτερα, μειονέκτημα για αλγόριθμους που βασίζονται στα τοπικά ελάχιστα για να διαχωρίσουν ισοτοπικές κορυφές. Α Savitzky-Gobay filter (ψηφιακό φίλτρο) θα λειάνει τα δεδομένα.

b. **Κεντροποίηση (centroiding)** : Εδώ τα προβλήματα κυμαίνονται από σχετικά ασήμαντα, όπως π.χ. σε φάσματα υψηλής ανάλυσης, μέχρι και σοβαρά που αφορούν αλληλοκαλυπτόμενες Gaussians καμπύλες όπως συμβαίνει σε σήματα από παγιδευμένα ιόντα υψηλού φορτίου (ion trap). Γενικά, η κεντροποίηση σαν διαδικασία αλληλοσυνδέεται με το πρόβλημα να πάρουμε το ,αρχικά, αγνώστου κατάστασης φορτίο ενός πεπτιδίου, επειδή η κατάσταση του **φορτίου (z)** καθορίζει την απόσταση της ισοτοπικής κορυφής ( $1/z$ ). Το μοντέλο που προκύπτει χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει αναλυτικά **τον όγκο της κορυφής (peak volume)** και **το ύψος της κορυφής (height of the peak)**. Συχνά, ο όγκος της κορυφής λαμβάνεται ως η **ένταση (intensity)** της **κεντροποιημένης κορυφής (centroid peak)**, επειδή αντιστοιχεί κατευθείαν στο φορτίο του ιόντος. Στα φάσματα υψηλής ευκρίνειας το ύψος της κορυφής (απλούστερος προσδιορισμός) χρησιμοποιείται εξίσου καλά.

## 2<sup>ο</sup> επίπεδο : Διαδικασία ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών στην MS

Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, **οι μέθοδοι σήμανσης που βασίζονται σε σταθερά ισότοπα (stable isotope-based labeling**, π.χ. SILAC ) αποτελούν σημείο αναφοράς. Είναι όμως αρκετά περίπλοκες, επειδή έχουν επιπλέον στάδια προετοιμασίας. Από την άλλη πλευρά, **οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης δίχως σήμανση (label free quantification – LFQ)** είναι απλούστερες και οικονομικότερες. Επιπρόσθετα, είναι εφαρμόσιμες σε οποιοδήποτε τύπο δείγματος, ιδιαίτερα σε υλικά που δεν μπορούν άμεσα να σημανθούν μεταβολικά, όπως τα περισσότερα κλινικά δείγματα. Ακόμη, δεν υπάρχει περιορισμός στον αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να συγκριθούν. Η ποιότητα και των δύο μεθόδων εξαρτάται από την υψηλή **διακριτική ικανότητα (resolution)**, την **ακρίβεια (accuracy)** καθώς και την υψηλή ικανότητα ταυτοποίησης πεπτιδίων. Συνολικά, η **υψηλή ανάλυση μάζας (high mass resolution)** είναι κομβική στην ακρίβεια της ποσοτικοποίησης.

Οι Cox et al.,2014<sup>(93)</sup> επισημαίνουν ότι οι μέθοδοι LFQ αντιμετωπίζουν τρία σημαντικά προβλήματα. 1<sup>ο</sup>) Το πρόβλημα της κανονικοποίησης (normalization) των MS/MS runs. Συναντάται στο πως θα συγκρίνουμε διαφορετικά δείγματα / κλάσματα δειγμάτων τα οποία έχουν αναλυθεί είτε σε ελαφρώς διαφορετικές συνθήκες είτε με διαφορετικές MS performance. 2<sup>ο</sup>) Το πρόβλημα αξιοποίησης της πληροφορίας από τη **μέγιστη αναλογία πεπτιδίων (maximum peptide ratio)**, το οποίο συναντάται κατά την επιλογή των πεπτιδικών σημάτων που συμβάλλουν στον βέλτιστο προσδιορισμό του πρωτεϊνικού σήματος στο δείγμα. 3<sup>ο</sup>) Επισημαίνεται ότι η επαναληψιμότητα της αναλυτικής πλατφόρμας είναι το αδύνατο σημείο στις μεθόδους LFQ, εφόσον οι επιτυχία της καθορίζεται από τις τεχνικές αποκλίσεις μεταξύ LC-MS runs, όντας εξαιρετικά ευαίσθητη σε αυτές. Οι ίδιοι<sup>(93)</sup> και οι Tyanova et

al.,2016<sup>(94)</sup> προτείνουν έναν αλγόριθμο MaxLFQ-MaxQuant πλήρως συμβατό με οποιοδήποτε πρωτεϊνικό διαχωρισμό πριν την LC-MS ανάλυση, με δυνατότητα χειρισμού μεγάλου αριθμού δειγμάτων (500+) για την επίλυση αυτών των προβλημάτων.

Οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης διακρίνονται επίσης σε<sup>(95)</sup> :

- I. **Μέθοδοι που βασίζονται στην ένταση του χαρακτηριστικού (feature-intensity based)**. Σε αυτές γίνεται προσπάθεια μέτρησης όλων των σημάτων που αντιστοιχούν σε ένα ειδικά φορτισμένο πεπτίδιο στο MS. Ο υπολογισμός της έντασης επιτυγχάνεται μέσω υπολογισμών από το ύψος της κορυφής ή από την **περιοχή κάτω από την καμπύλη κορυφής (area under the curve – AUC)**, για το κάθε πεπτίδιο στο λαμβανόμενο φάσμα της MS. Η καταγραφόμενη ένταση για κάθε πεπτίδιο είναι η άθροιση όλων των εντάσεων για όλα τα παρόντα ιόντα του πεπτιδίου. Ένας λόγος (ratio) υπολογίζεται για το εκάστοτε πεπτίδιο βασισμένος στις ευρεθείσες εντάσεις, σε κάθε μία κατάσταση. Συνδυάζοντας τους λόγους όλων των πεπτιδίων που αποδίδονται σε μια πρωτεΐνη εκτιμάται η **πρωτεϊνική αφθονία (protein abundance)**. Η αρχή της μεθόδου επιβεβαιώθηκε από τους Bondarenko et al.,2002.<sup>(96)</sup>
- II. Μέθοδοι **spectral-counting (SC)**. Σε αυτές έχουμε σύγκριση του αριθμού των MS/MS φασμάτων που αποδίδονται σε κάθε πρωτεΐνη. Η βασική παραδοχή αυτών των μεθοδολογιών συνίσταται στο ότι τα πεπτίδια που αφθονούν στο LC στάδιο θα δώσουν μεγάλες κορυφές στο προφίλ έκλουσης. Επομένως, είναι πιθανό, τόσο να ανιχνευθούν σε σχετικά μεγαλύτερο αριθμό φασμάτων, όσο και να επιλεγούν από μία σάρωση ανάλυσης θραυσμάτων(π.χ. σαν ένα από τα τρία πιο άφθονα παρόντα ιόντα). Η μέτρηση των παρατηρουμένων φασμάτων MS/MS για αυτό το ιόν θα είναι αντιπροσωπευτική της πεπτιδικής αφθονίας στο αρχικό δείγμα. Η εκτιμώμενη αφθονία της μητρικής πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί από τις τιμές αυτές των πεπτιδίων που έχουν αποδοθεί σε αυτήν με άθροιση των MS/MS φασμάτων τους. Η αρχή της μεθόδου τεκμηριώθηκε από τους Wang et al.,2003.<sup>(97)</sup>

Πολλές μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί, οι οποίες σκοπό έχουν να επεκτείνουν την απλή SC σε διαφορική πρωτεϊνική ποσοτικοποίηση, αξιοποιώντας υπολογιστικές διαφορές με τη χρήση *machine learning* τεχνικών. Σταχυολογούμε μερικές : α) Ο **δείκτης πρωτεϊνικής αφθονίας (protein abundance index – PAI)** καθώς και η εξελιγμένη μορφή του, ο **εκθετικά τροποποιημένος δείκτης πρωτεϊνικής αφθονίας (exponentially modified protein abundance index – emPAI)**. β) Η **απόλυτη πρωτεϊνική έκφραση ( absolute protein expression- APEX)**, η ισχυρή –με βάση την

**ένταση- μέση αναλογία (robust intensity-based averaged ratio\_RIBAR)**  
και η εξελιγμένη μορφή του, xRIBAR.

Οι τεχνικές που ανήκουν στην δεύτερη ομάδα (β) φαίνεται να υπερέχουν αυτών της πρώτης (α).

❖ Συγκρίνοντας μεθόδους intensity based με spectral counting :

- Οι μέθοδοι intensity-based εμφανίζουν μεγαλύτερη **ακρίβεια (accuracy)**
  - Οι μέθοδοι spectral-counting εμφανίζουν μεγαλύτερη **ευαισθησία (sensitivity)**
  - Ειδικότερα, οι λόγοι που μετρούνται από ένταση-κορυφής είναι πιο ακριβείς για πρωτεΐνες με μεγάλο αριθμό αλληλοεπικαλυπτόμενων ιόντων, ενώ οι λόγοι που μετρούνται με spectral-counting είναι πιο ακριβείς για πρωτεΐνες με μεγάλο αριθμό φασμάτων.
  - Αμφότερες εμφανίζουν παρόμοια **αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)**.
- ❖ Η Cathrine Mackay<sup>(95)</sup> συνιστά συνδυασμό τεχνικών και με τις δύο μεθόδους για βέλτιστη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.

### **3<sup>ο</sup> επίπεδο : α) Ευθυγράμμιση χαρτών (map alignment)**

Ο σκοπός αυτού του σταδίου είναι να προσδιορίσει τα ίδια πεπτιδικά χαρακτηριστικά μεταξύ των χαρτών για να είναι δυνατή η σύγκριση. Όμως, πέρα από την κατά ζεύγη ευθυγράμμιση των χαρτών, στο στάδιο αυτό επιζητείται η ομαδοποίηση των ορθών χαρακτηριστικών μεταξύ πληθώρας χαρτών.

### **3<sup>ο</sup> επίπεδο : β) Κανονικοποίηση (normalization)<sup>(91)</sup>**

Αποτελεί απαραίτητη διαδικασία για διόρθωση συστηματικών αποκλίσεων των μετρούμενων συχνοτήτων. Βασικό στάδιο για τις μεθόδους LFQ, το οποίο περιλαμβάνει τις διακυμάνσεις της έντασης σήματος, όπως συστηματικά σφάλματα στην πειραματική διαδικασία. Οι Callister et al.,2006<sup>(98)</sup> συγκρίνουν τις επιδόσεις τεσσάρων διαφορετικών στρατηγικών κανονικοποίησης : global normalization, linear regression, local regression, quantile normalization. Από τις προαναφερθείσες, εκτίμησαν ότι η quantile normalization υπερισχύει. Αυτή είναι μια στατιστική τεχνική που καθιστά δύο κατανομές ίδιες σε στατιστικές ιδιότητες.

Οι Cox et al.,2014<sup>(93)</sup> αντιμετώπισαν μια άλλη πλευρά του προβλήματος της κανονικοποίησης σε LFQ μεθόδους με **προ-κλασματοποίηση (pre-**

**fractionation**). Η ξεχωριστή επεξεργασία ανά δείγμα, αναπόφευκτα, εισάγει διαφορές στα προς σύγκριση κλάσματα. Λογικά, η ορθή κανονικοποίηση κάθε κλάσματος θα εξάλειφε το σφάλμα. Όμως, το συνολικό σήμα των πεπτιδικών ιόντων που είναι απαραίτητο για να κάνουμε κανονικοποίηση των LC-MS/MS runs κάθε κλάσματος, διαχέεται μεταξύ των αρκετών αλληλοδιάδοχων runs. Συνεπώς, δεν μπορούμε να συναθροίσουμε τα σήματα των πεπτιδικών ιόντων, πριν να γνωρίζουμε τους συντελεστές κανονικοποίησης του εκάστοτε κλάσματος. Επινόησαν, λοιπόν, μια απλή λύση, την **«καθυστερημένη κανονικοποίηση» (delaying normalization)**, την οποία και ενσωμάτωσαν στο λογισμικό τους MaxLFQ, πλήρως συμβατό με το MaxQuant.

Ύψιστο κριτήριο επιτυχούς κανονικοποίησης είναι οι εναπομείνασες συσχετίσεις (μετά τις διορθώσεις σήματος λόγω συστηματικού λάθους) μεταξύ των κορυφών να οφείλονται μόνο σε χημικές συσχετίσεις (π.χ. κατάσταση ιονισμού, πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, πρόσθετα και απώλειες ουδετέρων. Συμπερασματικά, η κανονικοποίηση αποτελεί λύση για τα σφάλματα.

### 5.1.2 Ελλείπουσες τιμές (missing values)<sup>(91,99)</sup>

Οι ελλείπουσες τιμές απαιτούν μεγάλη προσοχή στις LFQ πρωτεωμικές μελέτες. Σε προσεγγίσεις με LC-MS/MS συχνά κυμαίνονται από 10% έως και 50%, ενώ η αναλογία πεπτίδια/πρωτεΐνες, σε πεπτίδια που έχουν να επιδείξουν τουλάχιστον μια ελλείπουσα τιμή, μπορεί να είναι πολύ υψηλή, κυμαινόμενη από 70% έως 90%.<sup>(99)</sup>

Ελλείπουσα τιμή προκύπτει όταν ένα πεπτίδιο ανιχνεύεται σε κάποια δείγματα αλλά όχι σε άλλα. Στα δείγματα με ελλείπουσες τιμές, οι αφθονίες (abundances) δεν προσδιορίζονται. Οι αιτίες για την ύπαρξη των τιμών αυτών είναι :

- Δεν υπάρχουν πραγματικά στο δείγμα τα πεπτίδια.
- Μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα τα πεπτίδια, αλλά σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης του μηχανήματος.
- Μπορεί να υπάρχουν, αλλά είτε απλά να μην ανιχνεύθηκαν είτε να ανιχνεύθηκαν λανθασμένα για άγνωστους λόγους.

Οι ελλείπουσες τιμές μπορούν να διαχωριστούν σε **missing completely at random-MCAR values (είναι abundance-independed)** και σε **missing not at random-MNAR values (είναι abundance-depended)**. Η εμφάνιση των MCAR οφείλεται σε μικρές **δυσλειτουργίες (glitches)** της οργανολογίας (π.χ. φτωχός ιονισμός, ανταγωνισμός πεπτιδίων για το φορτίο κλπ.). Τα τυχαία λάθη αναμένεται να πλήξουν μικρή αναλογία των πεπτιδίων, σε αντίθεση με τις MCAR τιμές που πλήττουν ολόκληρο το πακέτο των δεδομένων με



ομοιόμορφη κατανομή. Η απόδοση των MCAR τιμών γίνεται με απλές μεθόδους.

Όσον αφορά στα λάθη που εξαρτώνται από την αφθονία των πεπτιδίων, υπάρχουν τρεις πιθανότητες : α) παντελής απουσία του πεπτιδίου, β) παρουσία του πεπτιδίου σε ποσότητα μικρότερη του ορίου ανίχνευσης του οργάνου και γ) η ποσότητα του πεπτιδίου να βρίσκεται πάνω από το όριο κορεσμού του ανιχνευτή από σήματα. Στην περίπτωση (β) δε γνωρίζουμε την ακριβή τιμή της έντασης του πεπτιδίου, παρά μόνο ότι η τιμή αυτή είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η μερικώς προσδιοριζόμενη τιμή (censored) περιγράφεται ότι υπέστη left censoring, ενώ στην περίπτωση (γ) η τιμή υπέστη right censoring. Ο υπολογισμός των MNAR τιμών είναι πολύ πιο πολύπλοκος και μπορεί να οδηγήσει προς τα πάνω τις εκτιμήσεις (upward-biases) και προς τα κάτω (downward-biased) τα standard errors.<sup>(91)</sup>

Η ερευνητική ομάδα Lazar et al., 2016<sup>(99)</sup> συγκρίνοντας στρατηγικές εκτίμησης των ελλειπουσών τιμών (missing values) συμπεραίνουν ότι όταν δεν γνωρίζουμε την φύση τους, συνιστάται να προσφεύγουμε στις MCAR τιμές. Επίσης, η επιλογή των MCAR ή MNAR πρέπει να προσαρμόζεται στη φύση των missing values. Τέλος, η επιλογή υβριδικών προσεγγίσεων μπορεί να αποτελέσει προοπτική για το μέλλον.

## 5.2 Εργαλεία για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων στην LC-MS με προσανατολισμό την πρωτεωμική / μετα-πρωτεωμική<sup>(100–103)</sup>

Οι πρωτεωμικές αναλύσεις με MS διακρίνονται με βάση τη στρατηγική ανάλυσης σε : 1) **top-down (αναλύονται ολόκληρες πρωτεΐνες)**, 2) **bottom-up (αναλύονται πεπτίδια)** και 3) **middle-down (συνδυασμός)**.

Οι bottom-up στρατηγικές είναι πεπτιδιο-κεντρικές. Δηλαδή, από τα ευρισκόμενα πεπτίδια προσδιορίζονται οι αναζητούμενες πρωτεΐνες. Αδυναμία της διαδικασίας αυτής αποτελεί η απόδοση σε μία πρωτεΐνη, του αθροίσματος των αναγνωρισμένων πεπτιδίων από την tandem MS, αναφερόμενη και ως *Protein inference problem*<sup>(104)</sup>. Ισχύει ο κανόνας ότι για να ανιχνευθεί με βεβαιότητα μια πρωτεΐνη χρειάζονται τουλάχιστον δύο βέβαια πεπτίδια. Το *Protein inference problem* δημιουργείται, λοιπόν, αφ' ενός από πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν από ένα πεπτίδιο και αφ' ετέρου από εκφυλισμένα πεπτίδια (degenerate peptides) που αποδίδονται σε πολλαπλές πρωτεΐνες. Προέκυψε, λοιπόν, η ανάγκη να εκτιμηθεί το ποσοστό των λανθασμένων ανιχνεύσεων πεπτιδίων. Το **FDR (false discovery rate)** περιγράφει αυτό το ποσοστό. Για τον υπολογισμό του χρησιμοποιήθηκε μια επιτυχημένη **στρατηγική «στόχου – δολώματος» (target-decoy)**<sup>(102)</sup>. Η στρατηγική συνίσταται στη δημιουργία **κατασκευασμένων** (ανύπαρκτων στη φύση) **αλληλουχιών (decoy sequences)**. Αυτές σαρώνονται μαζί με τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την αντιστοίχιση των φασμάτων της MS

του δείγματος με την προβλεπόμενη – μορφοποιημένη (FASTA-formatted) λίστα πρωτεϊνικών αλληλουχιών (π.χ. UniProt/SwissProt ή International Protein Index). Η αναζήτηση πραγματοποιείται με διάφορες μηχανές αναζήτησης (π.χ. Sequest, Mascot, X!Tandem) που υπολογίζουν μια **βαθμολογία (score)** ενδεικτικό του βαθμού όπου παρατηρούμενα και προβλεπόμενα MS/MS φάσματα συμφωνούν. Με τη μεθοδολογία “Target-Decoy” μπορούμε να υπολογίσουμε τις ψευδώς **θετικές αντιστοιχίσεις πεπτιδίου-φάσματος (peptide-spectrum matches\_PSM)** και το FDR. Στην κατεύθυνση, μερικής επίλυσης του *protein inference problem* θέτουμε αυστηρό όριο φιλτραρίσματος ορίζοντας  $FDR = 0.01$  κατά τη σάρωση της βάσης δεδομένων, στοχεύοντας σε ταυτοποίηση **«βέβαιων» (confident)** πεπτιδίων.

Το αυστηρό φιλτράρισμα με το FDR μας προφυλάσσει από τις **ψευδώς θετικές αντιστοιχίσεις (false positive matches)**. Μπορεί, όμως, να οδηγήσει και σε ψευδώς αρνητικές αντιστοιχίσεις. Οι Jagtap et al.,2013<sup>(103)</sup> για να αντιμετωπίσουν αυτό το πρόβλημα επινόησαν μια **μέθοδο έρευνας βάσεων δεδομένων σε δύο στάδια (a two-step database search)**, επιτυγχάνοντας σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας στην αντιστοίχιση-αλληλούχιση πεπτιδίων σε μετα-πρωτεωμικές και πρωτεογενωμικές μελέτες. Η μέθοδος έτυχε ευρείας αποδοχής. Χαρακτηριστικά, εφαρμόζοντας αυτή τη μέθοδο οι Tanca et al.,2014<sup>(68)</sup> πέτυχαν την μεγαλύτερη, στην μέχρι τώρα γνωστή βιβλιογραφία, ανίχνευση πρωτεϊνών (9000) και πεπτιδίων (13000) σε δείγματα από το τυφλό τμήμα του εντέρου ποντικού.

### 5.3 Επαγγελματικά Λογισμικά για ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών χωρίς σήμανση σε πρωτεωμική / μετα-πρωτεωμική ανάλυση με MS<sup>(105–107)</sup>

Οι Al Shweiki et al.,2017<sup>(106)</sup> αναφέρουν ως πιο δημοφιλή λογισμικά τα εξής:

- MaxQuant LFQ (MQ)
- Progenesis QIP
- Proteome Discoverer (PD)
- Scaffold

MaxQuant και Progenesis αποδεικνύονται να δίνουν accurate and precise αναλογικές εκτιμήσεις (> από 2 τάξεις μεγέθους) της πρωτεϊνικής αφθονίας τόσο για μικρές όσο και για μεγάλες αλλαγές επιπέδου.

➤ MaxQuant για σετ δεδομένων 1000-2000 πρωτεϊνών.

- QIP για πολύπλοκο πρωτέωμα, λόγω αυξημένης ευαισθησίας. Αρνητικό του, ότι δεν επιτρέπει τον εκ των προτέρων υπολογισμό του FDR.

Φέτος (2018), δημοσιεύτηκε η εργασία 11 κορυφαίων ερευνητών<sup>(107)</sup> στον τομέα της μετα-πρωτεωμικής, που αφορούσε μια βιοπληροφορική πλατφόρμα, την Galaxy, για την πρωτεωμική (Galaxy-P) και στόχευε στην διάχυση μετα-πρωτεωμικών λογισμικών. Περιγράφουν μια δομή που περικλείει τις απαιτήσεις που βρίσκονται στον πυρήνα ενός μετα-πρωτεωμικού λογισμικού : τη δημιουργία βάσεων δεδομένων, την αντιστοίχιση φασμάτων MS με πεπτίδια, την ταξονομική κατηγοριοποίηση και την λειτουργική ανάλυση.

### Βήμα 1<sup>ο</sup> : Δημιουργία βάσεων δεδομένων πρωτεϊνών

Με την βοήθεια υπολογιστή (in silico), γίνεται μετάφραση μιας μεταγενωμικής βάσης δεδομένων σε μετα-πρωτεωμική FASTA-ALL (FASTA), που περιέχει τα **προβλεπόμενα (predicted)** πρωτεώματα πολλών οργανισμών. Για την αποφυγή λανθασμένων αντιστοιχίσεων συνιστάται να συμπεριλαμβάνεται βάση δεδομένων FASTA-formatted του ξενιστή και κοινοί εργαστηριακοί πρωτεϊνικοί επιμολυντές (π.χ. κερατίνες δέρματος, πρωτεάσες). Οι ερευνητές υπογραμμίζουν ότι τα τελικά αποτελέσματα θα είναι τόσο καλά όσο και η βάση πρωτεϊνικών αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκε. Ιδανικά, η βάση δεδομένων κατασκευάζεται από τη γνωστή ταξονομική σύνθεση του εξεταζόμενου δείγματος (μεταγενωμική ανάλυση του εξεταζόμενου δείγματος ή ολοκληρωμένη-δημοσιευμένη ταξονομική μεταγενωμική βάση).

### Βήμα 2<sup>ο</sup> : Αντιστοίχιση φασμάτων και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών<sup>(55)</sup>

Πολλές στρατηγικές έχουν δοκιμαστεί για να αυξήσουν την ευαισθησία της ανίχνευσης πεπτιδίων για τις μεγάλες βάσεις αλληλουχιών της μετα-πρωτεωμικής. Η μέθοδος δύο βημάτων για σάρωση τέτοιων βάσεων που προτάθηκε από τους Jagtap et al.,2013<sup>(103)</sup> εξασφαλίζει ικανοποιητική ευαισθησία.

### Βήμα 3<sup>ο</sup> : Ταξονομική κατηγοριοποίηση<sup>(108-113)</sup>

Τα πεπτίδια, που ανιχνεύονται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ταξονομικό προσδιορισμό δείγματος. Οι ερευνητές διαθέτουν αρκετές επιλογές για ταξονομική κατηγοριοποίηση από τα μετα-πεπτιδικά δεδομένα. Αναφορικά: 1) UniPept, σχεδιάζει ακολουθίες που αναφέρονται σε μικροβιακούς οργανισμούς , οι οποίοι περιέχονται στο UniProt knowledge

base και αφού τις υποβάλλει στην ανάλυση «**χαμηλότερου κοινού προγόνου**» (“**lowest common ancestor**”–**LCA**), παρέχει μια λίστα ταξονομικών ανιχνεύσεων (επίπεδο βασιλείου, φύλου, γένους, ή δυνατόν είδους), 2) BlastP

#### Βήμα 4<sup>ο</sup> : Λειτουργική ανάλυση <sup>(108–113)</sup>

Η μετα-πρωτεωμική πλεονεκτεί, ιδιαίτερα στις μικροβιακές κοινότητες, επειδή μπορεί να προσδιορίσει την λειτουργική υπογραφή της συγκεκριμένης κοινότητας σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η ομάδα των 11, χρησιμοποιώντας το Unipept tool -αναπτυγμένο στην Galaxy πλατφόρμα- μέσω της Pept2Prot option, σχεδιάζει πεπτιδικές αλληλουχίες ήδη ανιχνευμένες σε πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, αυτές σχεδιάζονται με ορολογία της **Gene Ontology (GO)** και κατηγοριοποιούνται σε : α) **μοριακή λειτουργία (Molecular Function – MF)**, **κυτταρική τοποθέτηση (Cellular Components – CC)**, **βιολογικές διαδικασίες (Biological Processes – BP)**.

- ❖ Οι Starr et al.,2018<sup>(55)</sup> κατηγοριοποιούν το 1<sup>ο</sup> βήμα ως προστάδιο, τα βήματα 2 και 3 ως κυρίως στάδιο με δύο φάσεις (ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών) και το 4<sup>ο</sup> βήμα ως μετα-διαδικαστικό.

## Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Το εντερικό μικροβίωμα διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στην υγεία όσο και στην ασθένεια ενός οργανισμού. Η μετα-πρωτεωμική είναι μια σημαντική αναδυόμενη μεθοδολογία στην έρευνα μικροβίων, συμπληρωματική των καθιερωμένων γονιδιωματικών προσεγγίσεων, η οποία ταυτοποιεί μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών από μικροβιακές κοινότητες.

Κεντρικό σκοπό της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτέλεσε η εφαρμογή της μετα-πρωτεωμικής ανάλυσης σε ένα μοντέλο εντερικής φλεγμονής, επαγόμενης από το βακτήριο *Citrobacter rodentium*, ώστε να διερευνηθούν οι αλλαγές τόσο στο μικροβίωμα όσο και στις πρωτεΐνες του ξενιστή. Συγκεκριμένα, ως επιμέρους στόχοι τέθηκαν:

- Η μελέτη του πρωτεώματος του ξενιστή/ποντικού στην κατάσταση εντερικής φλεγμονής, σε συνάρτηση με την έκφραση της πρωτεΐνης HuR που σχετίζεται με την ανοσολογική απάντηση.
- Η μετα-πρωτεωμική μελέτη και ταξονομική ανάλυση σε δείγματα κοπράνων ποντικού στην κατάσταση εντερικής φλεγμονής.
- Πρωτεωμική ανάλυση ολόκληρου του πρωτεώματος του βακτηρίου *Citrobacter rodentium*.

## 6 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

### 6.1 Δείγματα κοπράνων από διαγονιδιακά ποντίκια

Λάβαμε, ομογενοποιημένα σε 1 mL PBS, δείγματα κοπράνων από διαγονιδιακά ποντίκια. Αυτά προέρχονταν από το εργαστήριο του Ερευνητή Α' Δρ. Δημήτριου Κοντογιάννη, του τμήματος Ανοσολογίας του Ε.Κ.Ε.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Τα διαγονιδιακά ποντίκια είχαν γονότυπους :

- IEC-HuRko (VillinCre<sup>+</sup> HuR<sup>ff</sup>): δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη HuR στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου.
- M-HuRko (LysozymeCre<sup>+</sup> HuR<sup>ff</sup>): δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη HuR στα μυελοειδή κύτταρα.
- Control group: VillinCre<sup>-</sup>HuR<sup>ff</sup> και LysozymeCre<sup>-</sup> HuR<sup>ff</sup> ποντίκια ελέγχου που εκφράζουν κανονικά τη HuR.
- Tg+ : υπερεκφράζουν τη HuR.
- Tg- ( or wild type) : εκφράζουν φυσιολογικά τη HuR, ποντίκια ελέγχου.

❖ Οι ποντικοί αυτοί είχαν μολυνθεί με το βακτηριακό στέλεχος DBS100 του *C. rodentium* (ATCC 51459)<sup>(44)</sup>. Ο βακτηριακός ενοφθαλμισμός (εμβόλιο) προετοιμάστηκε όπως περιγράφεται από τους Bouladoux et al.,2017<sup>(114)</sup> Εν συντομία, το στέλεχος DBS100 του *C. rodentium* (ATCC 51459) καλλιεργήθηκε σε αρχική στατική φάση σε ζωμό Luria-Bertani κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37 ° C υπό ανάδευση σε 200 rpm. Η καλλιέργεια περιστράφηκε για 10 min στα 3000 X g και το ίζημα πλύθηκε δύο φορές σε παγωμένο PBS. Ποντίκια ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων έλαβαν, με εκ του στόματος καθετήρα, από 2-3x10<sup>9</sup> CFU σε εναιώρημα 200 μl σε PBS μετά από 8 ώρες νηστείας. Για να μειωθεί η μετάδοση από ποντικό σε ποντικό, οι ποντικοί ήταν εγκλωβισμένοι είτε σε μονάδες είτε σε δυάδες. [Οι καλλιέργειες με *C. rodentium* πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Biosafety Level 2 του "Alexander Fleming", από τον μεταδιδασκτορικό ερευνητή Φώτη Ιωακειμίδη, μέλος του εργαστηρίου του Ερευνητή Α' Δρ. Δημητρίου Κοντογιάννη, του τμήματος Ανοσολογίας του Ε.Κ.Ε.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».]

### 6.2 Πρωτόκολλο επεξεργασίας δειγμάτων

Το ομογενοποιημένο, σε διάλυμα PBS, δείγμα κοπράνων φυγοκεντρήθηκε στα 100 X g για 3 min. Το υπερκείμενο αναμίχθηκε 1: 1 με ρυθμιστικό διάλυμα 2x λύσης (8% SDS [SDS ultra pure, Applichem, Germany], 0.2 M DTT [1,4-

Dithiothreitol, Sigma-Aldrich, Germany], 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 [ TrisHCl / TrisBase, Sigma-Aldrich, Germany]) και υποβλήθηκε σε θέρμανση 95°C, για 5min και σε παλμική κατεργασία υπερήχων (Vivra Cell™ / Ultrasonic Processor, settings: Amplitude→60 , Pulsed) για 30 sec x 2, με διάστημα παύσης 45 sec. Το δείγμα τελικά καθαρίστηκε από αδιάλυτο υλικό με φυγοκέντρηση στα 14000xg για 20 min.

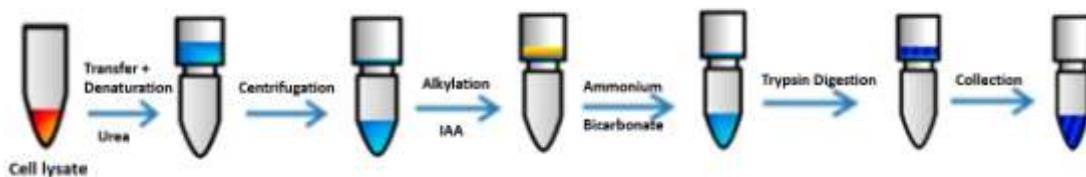
### 6.2.1 Πέψη πρωτεϊνών

Εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα πέψης με θρυψίνη. Το FASP (Filter Aided Sample Preparation)<sup>(71-75)</sup> (Σχήμα 6.1) και το SP3 (Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample-Preparation)<sup>(81-84)</sup> (single pot protocol) (Σχήμα 6.2)

#### 6.2.1.1 Διαδικασία FASP

- Στο πρωτεϊνικό δείγμα (20-100μg) προστίθεται 300μL διαλύματος ουρίας (8M ουρία [Urea, Sigma-Aldrich, Germany], σε 100mM Tris-HCl pH 8.5-UA). Το δείγμα τοποθετείται σε φίλτρα με Mw cut-off 10KDa (Sartorius, Fischer Scientific, U.S.) που προσαρμόζονται με τη σειρά τους σε φιαλίδια τύπου erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000Xg για 20min.
- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές.
- Ακολουθεί προσθήκη 100μL διαλύματος ιωδοακεταμιδίου 0.05M (IAA/Iodacetamide, Acros Organics, U.S.) και ανάδευση σε 600rpm για 1min. Αφήνονται σε ηρεμία να επωαστούν για 20min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000Xg για 20min.
- Πραγματοποιείται έκπλυση του φίλτρου δείγματος με 300μL UA και φυγοκέντρηση στα 14000Xg για 20min. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές.
- Προστίθενται 200μL διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (Ammonium Bicarbonate/Ambic, Sigma-Aldrich, Germany) για έκπλυση των φίλτρων των δειγμάτων και φυγοκέντρηση στα 14000Xg για 20min. Στην περίπτωση που το διάλυμα έκπλυσης δεν έχει απομακρυνθεί εντελώς από το φίλτρο, η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται. Το βήμα επαναλαμβάνεται δύο φορές.
- Προστίθεται 40μL θρυψίνη (Golden Trypsin, Mass Spec grade, Promega, U.S.) συγκέντρωσης 12.5 ng/μL σε 50mM όξινου ανθρακικού νατρίου (Ambic) και ανάδευση στα 600rpm για 1min.

- Τα φίλτρα μεταφέρονται σε νέους σωλήνες erpendorf και αφήνονται στους 37°C ολονύκτια, σε συνεχή ανάδευση στα 300rpm.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 14000Xg για 10min. Κρατάμε το διήθημα που περιέχει τα πεπτίδια.
- Προστίθενται 100μL H<sub>2</sub>O και τα δείγματα αφήνονται υπό ανάδευση (1h, 37°C, 300rpm).
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στα 14000g για 30min.
- Τα δείγματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε Speedvac.
- Προσθέτουμε 30μL διαλύματος 2% ακετονιτρίλιο(Merck,Germany) σε 0.1% φορμικό οξύ(Merck,Germany) και επωάζουμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο υπερήχων για 3min.
- Προσδιορίζουμε την συγκέντρωση των πεπτιδίων από την απορρόφηση στους 280nm σε συσκευή nanodrop.



**Σχήμα 6.1:** Αναπαράσταση της διαδικασίας FASP

## ΣΥΣΚΕΥΕΣ:

Φυγόκεντρος εξάτμισης (SAVANT SPD1010 SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific).

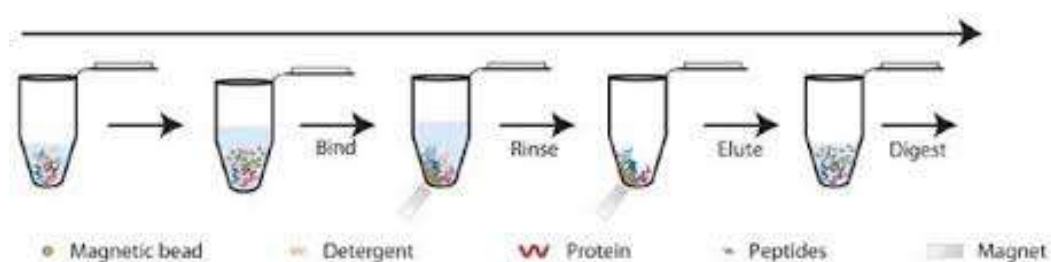
Φωτόμετρο (IMPLEN Nanometer P330)

### 6.2.1.2 Διαδικασία SP3

80 μL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμίχθηκαν με ίσο όγκο διαλύματος ιωδοακεταμιδίου (IAA/Iodacetamide, Acros Organics, U.S.) 200 mM σε τελική συγκέντρωση 100 mM και το μίγμα αφέθηκε στο σκοτάδι για να αντιδράσει για 30 min. Μετά την αντίδραση, 2 μL από ένα διάλυμα σφαιριδίων προστέθηκαν στο προϊόν λύσεως 10 μg/μL υδρόφιλων παραμαγνητικών σφαιριδίων που αγοράστηκαν από την GE (Speed Bead Magnetic Carboxylate modified Particles cat No 65152105050250 and 45152105050250). Η δέσμευση της πρωτεΐνης ξεκίνησε με την προσθήκη ίσου όγκου απόλυτης



αιθανόλης(Merck,Germany) σε τελική συγκέντρωση αιθανόλης 50%. Το μίγμα αναμίχθηκε για 5 min στις 1000 rpm και τοποθετήθηκε σε μαγνητική βάση για 2 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το μαγνητικό ίζημα πλύθηκε 3 φορές, εκτός μαγνητικής βάσης, με 180  $\mu$ L αιθανόλης 80%. Το μαγνητικό ίζημα αφέθηκε να ξηραθεί σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την πέψη με 1  $\mu$ g θρυψίνης(Golden Trypsin, Mass Spec grade, Promega, U.S.) σε 180  $\mu$ L από 200mM διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (Ammonium Bicarbonate / Ambic, Sigma-Aldrich, Germany), όλη τη νύκτα. Την επόμενη ημέρα, ο σωλήνας αντίδρασης υπεβλήθη σε υπερήχους (συχνότητα 35kHz, Bandelin Sonorex) για 5 min και αφέθηκε στη μαγνητική βάση για 5 min. Το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε τα πεπτιδία, συλλέχθηκε και ξηράνθηκε με, υποβοηθούμενη από SpeedVac, αφαίρεση διαλύτη και επανασυγκροτήθηκε σε διάλυμα 2% (v/v) ACN(Merck,Germany) και 0.1% (v/v) φορμικού οξέος(Merck,Germany). Το πεπτιδικό διάλυμα επωάστηκε για 3 min σε υδατόλουτρο υπερήχων. Η συγκέντρωση του πεπτιδίου προσδιορίστηκε με μέτρηση απορρόφησης nanodrop στα 280 nm.



**Σχήμα 6.2:** Αναπαράσταση της διαδικασίας SP3

### 6.3 Υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (nanoUHPLC-MS/MS)

2.5  $\mu$ g πεπτιδίων προ-συμπυκνώθηκαν με ροή 3  $\mu$ L/min για 10 min χρησιμοποιώντας στήλη- παγίδας C18 (Acclaim PepMap100, 100 $\mu$ m x 2cm, Thermo Scientific) και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε μία στήλη C18 μήκους 50 cm (75  $\mu$ m ID, particle size 2  $\mu$ m, 100 $\text{\AA}$ , Acclaim PepMap100 RSLC, Thermo Scientific). Οι δυαδικές αντλίες της HPLC (RSLCnano, Thermo Scientific) αποτελούνταν από το διάλυμα A (ACN 2% (v/v) σε φορμικό οξύ 0.1% (v/v)) και το διάλυμα B (80% (v/v) ACN σε φορμικό οξύ 0.1% (v/v)). Τα πεπτιδία διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας γραμμική βαθμίδα από 4% B έως 40% B σε 210 min με ρυθμό ροής 300 nL/min. Η στήλη τοποθετήθηκε σε κλίβανο που λειτουργούσε στους 35°C. Τα εκλουόμενα πεπτιδία ιονίσθηκαν με πηγή ψεκασμού και ανιχνεύθηκαν με φασματόμετρο μάζας LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ) που λειτουργούσε σε τρόπο εξαρτώμενο από δεδομένα (DDA: data dependent mode). Τα φάσματα MS πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στο orbitrap (m/z 300-1600) σε κατάσταση

προφίλ (profil mode) με την ανάλυση (resolution) ρυθμισμένη στις 60000 στα  $m/z$  400 και τον αυτόματο στόχο ελέγχου κέρδους (automatic gain control target) στα 106 ιόντα. Τα έξι πιο έντονα ιόντα απομονώθηκαν διαδοχικά για MS / MS κατακερματισμό που προκαλείται από σύγκρουση (CID: collision-induced) και για ανίχνευση στη γραμμική παγίδα ιόντων. Ο δυναμικός αποκλεισμός ρυθμίστηκε στο 1 min και ενεργοποιήθηκε για 90 δευτερόλεπτα. Έχουν αποκλειστεί ιόντα με απλή κατάσταση φόρτισης. «Κλείδωμα» του λόγου  $m/z$  445.120025 χρησιμοποιήθηκε για συνεχή εσωτερική βαθμονόμηση. Το Xcalibur (Thermo Scientific) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του συστήματος και την απόκτηση των ακατέργαστων αρχείων (raw files).

## 6.4 Πρωτόκολλα επεξεργασίας δεδομένων δειγμάτων κοπράνων

### 6.4.1 Ανάλυση MaxQuant

Διαφορική ανάλυση πρωτεωμικής έκφρασης χωρίς σήμανση : Τα ακατέργαστα αρχεία (raw files) της φασματομετρίας μάζας πρωτεΐνης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο MaxQuant<sup>(93,115–119)</sup> (έκδοση 1.6.1.0). Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε έναντι στις πλήρεις καταχωρήσεις του *Mus musculus* από το Uniprot (102 824 καταχωρήσεις, 22/5/2018) και μια κοινή βάση δεδομένων για τους μολυντές από την μηχανή αναζήτησης Andromeda<sup>(120)</sup>. Οι παράμετροι αναζήτησης ήταν πρώτον η αυστηρή εξειδίκευση στην θρυψίνη, επιτρέποντας μέχρι δύο αποτυχημένες αποκοπές (missed cleavages) και δεύτερον το ελάχιστο μήκος πεπτιδίων σε επτά αμινοξέα. Τα FDRs των πεπτιδίων και πρωτεϊνών ρυθμίστηκαν στο ελάχιστο: 1%. Η κύρια ανοχή αναζήτησης καθορίστηκε σε 4.5 ppm. Η οξειδωση των μεθειονινών, η απαμίδωση της γλουταμίνης και της ασπαραγίνης και η N-τερματική ακετυλίωση ορίστηκαν ως μεταβλητές τροποποιήσεις. Η καρβαμιδομεθυλίωση κυστεΐνης χρησιμοποιήθηκε ως σταθερή τροποποίηση. Η λειτουργία "δεύτερο πεπτίδιο" ενεργοποιήθηκε. Η αφθονία των πρωτεϊνών υπολογίστηκε με βάση την κανονικοποιημένη ένταση φασματικής πρωτεΐνης (normalized spectral protein intensity), μέσω της ποσοτικοποίησης χωρίς σήμανση (label free quantification/LFQ intensity), επιτρέποντας την επιλογή "match between runs". Χρήση προεπιλεγμένων ρυθμίσεων. Η LFQ εκτελέστηκε με ένα ελάχιστο ποσοστό αναλογίας 2.

### 6.4.2 Ανάλυση δύο βημάτων – Galaxy

Τα ακατέργαστα αρχεία (raw files) αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας μια στρατηγική δύο βημάτων παρόμοια με αυτή των δημοσιευμένων μετα-πρωτεϊνικών αναλύσεων<sup>(103,107,121)</sup>. Τα πρωτογενή αρχεία αναζητήθηκαν μέσω της μηχανής αναζήτησης XTandem, Galaxy έκδοση 1.1.1, έναντι του

συγχωνευμένου αρχείου FASTA που δημιουργήθηκε από: i) το πρωτέωμα εντέρου ποντικών (που δημιουργήθηκε από ανάλυση NGS δειγμάτων κοπράνων από 184 διαφορετικούς ποντικούς, ref 5) ii) Uniprot all, iii) *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* και iv) το πρωτέωμα από Uniprot του *Citrobacter rodentium* που περιέχει συνολικά 6 399 376 αλληλουχίες.

Οι συνθήκες αναζήτησης ήταν 10 ppm για MS1 και 0.5 Daltons μάζας ανοχής για MS/MS. Οι λίστες πρωτεϊνών που δημιουργούνται, συγχωνεύονται και φιλτράρονται για περιττές καταχωρήσεις, δημιουργώντας ένα νέο αρχείο FASTA (θα αναφέρεται ως Galaxy685 παρακάτω) που περιέχει 678 379 καταχωρήσεις. Η νέα βάση δεδομένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε τόσο σε αναζήτηση μέσω MaxQuant, όπως περιγράφεται παραπάνω, όσο και σε αναζήτηση μέσω του Proteome Discoverer (v1.4).

### 6.4.3 Στατιστική ανάλυση – Perseus

Η στρατηγική της στατιστικής ανάλυσης στο Perseus (έκδοση 1.6.1.3) ακολούθησε την εξής διαδικασία<sup>(122,123)</sup>:

- 1) Loading: Επιλέγω, από το συνδυασμένο αρχείο (combined txt) που έδωσε ως αποτέλεσμα το MaxQuant, το αρχείο Protein Groups και διαλέγω τα LFQ intensities που θα χρησιμοποιήσω
- 2) Filtering: Αφαιρώ τις τιμές που αντιστοιχούν σε a) only identified by site, b) reverse, c) potential contaminants
- 3) Annotations: Χρησιμοποιώ για σχολιασμό/ονομασία των πρωτεϊνών βάση δεδομένων που αφορά τον ξενιστή/ποντικό (*mus musculus*), καθώς και σχολιασμούς/ονομασίες από GOBP, GOMF, GOCC, KEGG.
- 4) Transformation: Οι τιμές των εντάσεων LFQ μετασχηματίζονται σε λογαριθμικές (Log10), (οι μηδενικές γίνονται NaN: not a number).
- 5) Grouping of samples: Ομαδοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με τον γονότυπο, την χρονική στιγμή (ημέρα) ή και τα δύο.
- 6) Filtering according to groups: Φιλτράρισμα σύμφωνα με τις ομάδες και με κριτήριο τις έγκυρες τιμές (based on valid values) σε ποσοστό 50%.
- 7) Imputation: Οι χαμένες τιμές (missing values –NaN) αντικαταστάθηκαν από μια χαμηλή τιμή με βάση την κανονική κατανομή (normal distribution), υποθέτοντας ότι η αντίστοιχη πρωτεΐνη βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στο δείγμα.
- 8) Tests: Για τη σύγκριση των δειγμάτων ανά δύο διεξήχθησαν ‘Two-sided Student t-tests’ με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p\text{-value} \leq 0.05$ .

- 9) Volcano Plots: Εξάγονται διαγράμματα τύπου Volcano, όπου οι καρτεσιανές συντεταγμένες της κάθε πρωτεΐνης, είναι η τιμή του δεκαδικού λογαρίθμου του λόγου της έντασης ( $\text{Log}_{10}\text{FoldChange}$ ) της κάθε πρωτεΐνης στα δείγματα της μίας ομάδας (π.χ. Control) προς της αντίστοιχης στα δείγματα της άλλης ομάδας (π.χ. IEC-HuRko) στον άξονα  $x$  και ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του  $p$ -value στον άξονα  $y$ .
- 10) Filtering of Significant: Επιλέγουμε και κρατάμε μόνο τις στατιστικά σημαντικές τιμές που έχουν προκύψει από τα  $t$ -tests (Student  $t$ -test Significant).
- 11) Normalization: Κανονικοποίηση των στατιστικά σημαντικών τιμών μέσω 'z-scoring', όπου ο μέσος όρος κάθε σειράς / στήλης αφαιρείται από κάθε τιμή και έπειτα το αποτέλεσμα διαιρείται με την τυπική απόκλιση κάθε σειράς / στήλης.
- 12) Clustering: Αυτή η δραστηριότητα εκτελεί ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) από σειρές ή / και στήλες και παράγει έναν οπτικό χάρτη θερμότητας (heat map) που αντιπροσωπεύει την εκάστοτε συστοιχία μήτρας (matrix).
- 13) Average groups: Υπολογίζεται ο μέσος όρος των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο.
- 14) Clustering : Ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) αυτή τη φορά στις συστοιχίες μήτρας (matrix) που έχουν δημιουργηθεί από το προηγούμενο (13) βήμα.
- 15) Heat Maps : Εξαγωγή οπτικής απεικόνισης με θερμικούς χάρτες από τα βήματα (12) και (14).

#### 6.4.4 Βιοπληροφορικά προγράμματα Panther και DAVID

Στον προηγούμενο άξονα ανάλυσης (MaxQuant – Perseus) που αφορά στο πρωτόμα του ξενιστή / ποντικού, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση με τη βοήθεια βιοπληροφορικών προγραμμάτων (ελεύθερης χρήσης μέσω διαδικτύου), όπως οι πλατφόρμες **Panther (Protein ANalysis THrough Evolution Relationships) Classification System**<sup>(124–128)</sup> (έκδοση 13.1, κυκλοφόρησε 2018-02-03, περιέχει 15 524 οικογένειες πρωτεϊνών, χωρισμένες σε 79 562 λειτουργικά ξεχωριστές υποοικογένειες πρωτεϊνών) και DAVID Bioinformatics Resources 6.8<sup>(129,130)</sup> (Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics – LHRI).

#### 6.4.4.1 Panther

Οι ταξινομήσεις της πλατφόρμας Panther είναι το αποτέλεσμα της ανθρώπινης επιμέλειας καθώς και περίπλοκων αλγορίθμων βιοπληροφορικής. Λεπτομέρειες των μεθόδων μπορούν να βρεθούν στα άρθρα <sup>(127,128)</sup>.

Το Panther υποστηρίζεται από ερευνητικές επιχορηγήσεις του Εθνικού Ινστιτούτου Ανθρώπινου Γονιδιώματος (National Human Genome Research Institute) και του Εθνικού Ιδρύματος Επιστημών (National Science Foundation) και διατηρείται από το εργαστήριο Thomas στο Πανεπιστήμιο της Νότιας Καλιφόρνιας.

#### Διαδικασία χρήσης του Panther<sup>(124–126)</sup> :

- Πληκτρολόγηση στο πλαίσιο 'Enter IDs' : Έγινε αντιγραφή/επικόλληση πολλαπλών αναγνωριστικών (IDs) σε μορφή λίστας εντός του πλαισίου, αφού πρώτα είχαμε ξεχωρίσει τα αναγνωριστικά (IDs) ανά διάστημα (χρήση Notepad<sup>++</sup>) (1<sup>st</sup> exp gene list matrix 10, 3<sup>rd</sup> exp gene list matrix11)
- Επιλογή του είδους της λίστας που υποβάλαμε προς ανάλυση (ID list)
- Επιλογή οργανισμού : Επειδή ορισμένα αναγνωριστικά στοιχεία, όπως τα σύμβολα γονιδίων, δεν είναι ειδικά για τον οργανισμό, είναι σημαντικό να επιλέξετε τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται τα αναγνωριστικά σας → Mus Musculus
- Επιλογή ανάλυσης : Λειτουργική ταξινόμηση που εμφανίζεται σε διάγραμμα πίτας ('Function classification viewed in pie chart')

#### 6.4.4.2 DAVID

#### Διαδικασία ενισχυμένης/εμπλουτισμένης ανάλυσης (enriched analysis) DAVID

- Φόρτωση λίστας γονιδίων / Upload gene list
  - Αντιγραφή/επικόλληση της λίστας γονιδίων (1<sup>st</sup> exp combined gene list matrix26,27,28 και 3<sup>rd</sup> exp combined gene list matrix68,70,72)
  - Επιλογή αναγνωριστικού / Select identifier → Official Gene Symbol
  - Επιλογή τύπου λίστας → λίστα γονιδίων/gene list
  - Υποβολή της λίστας / Submit
- Φόρτωση λίστας υποβάθρου
  - Αντιγραφή/επικόλληση της λίστας γονιδίων (1<sup>st</sup> exp gene list matrix 10 και 3<sup>rd</sup> exp gene list matrix11)

- Επιλογή αναγνωριστικού / Select identifier → Official Gene Symbol
- Επιλογή τύπου λίστας → λίστα υποβάθρου/background list
- Υποβολή /Submit
- Επιλογή είδους/select species →mus musculus

#### 6.4.5 Proteome Discoverer

Το **Proteome Discoverer** ( έκδοση 1.4) κάνει αναζήτηση με τη χρήση του 'Target-Decoy' αλγορίθμου έναντι της δημιουργημένης βάσης δεδομένων Galaxy685 και με όρια ψευδούς ποσοστού ανακάλυψης (false discovery rate) από 1% (αυστηρό) μέχρι 5%(χαλαρό) ( $0.01 \leq \text{FDR} \leq 0.05$ ). Επιπλέον, τέθηκαν ρυθμίσεις όπως :

- ✓ Precursor Mass Tolerance : 10ppm
- ✓ Fragment Mass Tolerance : 0.6 Da
- ✓ Dynamic Side Chain Modifications : Oxidation of methionines (M) (+15.995Da), Deamidation of glutamine (Q) and asparagines (N)
- ✓ Dynamic Peptide Modifications : N-terminal acetylation
- ✓ Static Side Chain Modifications : Carboxymethylation of cysteine (+57.021 Da)

Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται τα φίλτρα : i) 'peptide confidence' ρυθμισμένο στην επιλογή 'High' και ii) 'score versus charge state' ρυθμισμένο στο 'default'. Τέλος, λαμβάνουμε λίστα των πεπτιδίων, που πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις, καθώς και τα PSMs (Peptide Spectrum Matches) για το καθένα από αυτά.

#### 6.4.6 Unipept

Unipept / Metaproteomics Analysis tool<sup>(108–113)</sup>: εισάγουμε τη λίστα πεπτιδίων που λάβαμε από το Proteome Discoverer και κάνουμε αναζήτηση, ενεργοποιώντας τις επιλογές 'filter duplicate peptides' και 'advanced missed cleavage handling'. Για κάθε ένα από τα πεπτίδια, ο χαμηλότερος κοινός πρόγονος (LCA) θα υπολογιστεί, θα συγκεντρωθεί και θα απεικονιστεί στη σελίδα αποτελεσμάτων, δίνοντάς μας πληροφορίες για την ταξινομική ποικιλομορφία του δείγματος.

- Διαδραστικό ιστόγραμμα “treemap”
  - *Bacteroidetes*
  - *Firmicutes*
  - *Proteobacteria*

### 6.5 Πρωτόκολλο επεξεργασίας στερεής καλλιέργειας *Citrobacter rodentium*

Λάβαμε στερεή καλλιέργεια του Gram(-) βακτηρίου, *Citrobacter rodentium*, σε πλάκες Oxoid MacConkey Agar (CM0007B). [Οι καλλιέργειες με *C. rodentium* πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Biosafety Level 2 του "Alexander Fleming", από τον μετα-διδακτορικό ερευνητή Φώτη Ιωακειμίδη, μέλος του εργαστηρίου του Ερευνητή Α' Δρ. Δημητρίου Κοντογιάννη, του τμήματος Ανοσολογίας του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».] Αρχικά, χρησιμοποιώντας τη «λυγισμένη» (με φλόγα) άκρη γυάλινου σταγονόμετρου Pasteur, για δειγματοληψία, «ξύσαμε» ελαφρά (**scraping**) τις αποικίες της καλλιέργειας. Το δείγμα διαλύθηκε σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (1X) (4% SDS, 0.1 M DTT, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5), εντός σωλήνα erpendorf (χωρητικότητας 1,5 mL). Στη συνέχεια, ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) και θέρμανση στους 95°C για 3min. Κατόπιν, το διάλυμα/δείγμα υποβλήθηκε σε διαδικασία ταχείας ψύξης-απόψυξης ( **freeze and thaw**) τριών αλληλοδιάδοχων κύκλων, όπου κάθε κύκλος περιλαμβάνει : α) ένα στάδιο ταχείας ψύξης με εμβάπτιση ολόκληρου του erpendorf σε υγρό άζωτο, για 3min και β) ένα στάδιο ταχείας απόψυξης σε (προθερμασμένο) υδατόλουτρο, στους 42°C για 3min. Τέλος, το δείγμα υπόκειται σε παλμική κατεργασία υπερήχων (συχνότητα 35kHz, Bendelin Sonorex), για 15min.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE electrophoresis : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) και χρώση.

#### 6.5.1 SDS-PAGE electrophoresis

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ<sup>(131)</sup>:

- Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμιδίου : α) πηκτή διαχωρισμού (10%) (δ/μα ακρυλαμιδίου 40%[Bio-Rad Laboratories,U.S.], Tris-HCl 1M pH=8.8, SDS 10%, dH<sub>2</sub>O, APS 10%[Ammonium Persulfate,Sigma-Aldrich], TEMED[Thermo Fischer Scientific,U.S.]) και β) πηκτή επιστοίβασης (5%) (δ/μα ακρυλαμιδίου 40%, Tris-HCl 1M pH=6.8, SDS10%, dH<sub>2</sub>O, APS 10%, TEMED).

- Μεταφορά της πηκτής στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (10X running buffer : 0.25 M Tris, 1.92 M γλυκίνη, 1.0% SDS pH 8.3) μέχρι η πηκτή να είναι πλήρως βυθισμένη.
- Φόρτωση δειγμάτων : 1) Συνδυασμός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και 6X ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) (π.χ. 20μL + 4μL αντίστοιχα), 2) Θέρμανση στους 98°C για 3min, 3) Φυγοκέντρηση (quick spin down), 4) Φόρτωση διαλύματος πρωτεΐνης στο φρεάτιο της πηκτής.
- Ηλεκτροφοριστικός διαχωρισμός δειγμάτων : Παροχή ρεύματος αρχικά στα 50V για 30min και στη συνέχεια αύξηση στα 120V μέχρι ολοκλήρωσης του διαχωρισμού.

### 6.5.2 Χρώση με "Blue Silver" Coomassie Colloidal Blue

- Πριν από τη χρώση, σταθεροποίηση με:
  - 30% μεθανόλη(Merck,Germany)
  - 10% οξικό οξύ(Merck,Germany)
- Επώαση των πηκτωμάτων σε διάλυμα σταθεροποίησης για 30 min έως 1 ώρα.
- Μετά τη σταθεροποίηση πλύση των πηκτωμάτων 4 φορές με αποσταγμένο νερό (15 min για κάθε πλύση).
- Οι τελικές συγκεντρώσεις που υιοθετήθηκαν στο εργαζόμενο κολλοειδές διάλυμα "μπλε αργύρου" είναι:
  - 0.12%βαφή(Coomassie Brilliant blue G-250,C.I.42655,Merck,Germany)
  - 10% θειϊκό αμμώνιο(Merck,Germany)
  - 10% φωσφορικό οξύ(Merck,Germany)
  - 20% μεθανόλη(Merck,Germany)

Αυτό παράγει ένα σκούρο πράσινο διάλυμα βαφής, το οποίο μετατρέπεται σε ένα βαθύ μπλε όταν προσροφάται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι στερεωμένες στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Το διάλυμα βαφής παρασκευάζεται ως ακολούθως, προσθέτοντας διαδοχικά τα διάφορα συστατικά όπως υποδεικνύεται εδώ:

Σε ένα διάλυμα νερού (1/10 του τελικού όγκου) προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα φωσφορικού οξέος, έτσι ώστε στον τελικό όγκο η συγκέντρωσή του να είναι 10%. Σε αυτό, προσθέστε την απαιτούμενη ποσότητα θειϊκού αμμωνίου (σε σκόνη), που υπολογίζεται για να ληφθεί τελική συγκέντρωση



10%. Όταν το θειϊκό αμμώνιο έχει διαλυθεί, προσθέστε αρκετό Coomassie Blue G-250 (σε σκόνη) για να αποκτήσετε τελική συγκέντρωση 0,12%. Όταν όλα τα στερεά έχουν διαλυθεί, προσθέστε νερό στο 80% του τελικού όγκου. Σε αυτό το διάλυμα, υπό ανάδευση, προστίθεται άνυδρη μεθανόλη για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 20%. Αυτό το διάλυμα βαφής θα πρέπει να φυλάσσεται σε καφέ φιάλη και να είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου για > 6 μήνες.

- Για χρώση χρησιμοποιήστε περίπου 5 φορές τον όγκο της πηκτής. Για παράδειγμα για πηκτή περίπου 5 mL πρέπει να χρησιμοποιήσετε περίπου 20-25 mL αυτού του διαλύματος χρώσης. Κρατήστε τα πηκτώματα σε διάλυμα χρώσης για τουλάχιστον 3 ώρες ή καλύτερα για μια νύχτα.
- Αποχρωματίστε με απεσταγμένο νερό, κάνοντας πλύσεις 3-4 φορές.

### 6.5.3 Χρώση Νιτρικού Αργύρου (Silver nitrate staining protocol)<sup>(79)</sup>

Βήματα	Χρόνοι (min)	Σύσταση Αντιδραστηρίων
1. Σταθεροποίηση	20	50% v/v Μεθανόλη(Merck,Germany) 50% v/v Οξικό οξύ(Merck,Germany)
2. Πλύση	10	50% v/v Μεθανόλη(Merck,Germany)
3. Πλύση	120 ή ολονύκτια	Απιονισμένο H <sub>2</sub> O
4.«Ευαισθητοποίηση» ("sensitize")	1	0,02% w/v θειοθειϊκό νάτριο Sigma-Aldrich, Germany)
5. Πλύση	2 χ 1min	Απιονισμένο H <sub>2</sub> O
6. Χρώση	20	0,1%w/v νιτρικό άργυρο (Merck,Germany) (4°C)
7. Πλύση	2 χ 1min	Απιονισμένο H <sub>2</sub> O
8.«Ανάπτυξη» ("develop")	Μέχρις ότου η χρώση να είναι επαρκής (αλλαγή χρώματος)***	2% w/v ανθρακικό νάτριο(Merck,Germany), 0,04% v/v φορμαλδεϋδη (Sigma-Aldrich, Germany)
9. Λήξη της αντίδρασης	2 x 10min	5% v/v οξικό οξύ(Merck,Germany)
10. Αποθήκευση	για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4°C	1% v/v οξικό οξύ(Merck,Germany)

\*\*\* Παρατήρηση του χρώματος, όταν αλλάξει σε κίτρινο σταματάμε την αντίδραση. Τα λύματα που περιέχουν άργυρο θα πρέπει να συλλέγονται, να καταβυθίζονται με τη χρήση 2M HCl και να απορρίπτονται με κατάλληλο τρόπο.

## 6.6 Πέψη και UHPLC-MS/MS στα δείγματα *C. rodentium*

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα υποβλήθηκε, επίσης, σε πέψη με θρυψίνη με τη διαδικασία της FASP, όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως.

Στη συνέχεια ακολούθησε παρόμοια διαδικασία nanoUHPLC-MS/MS, με την παραπάνω περιγραφή, με μοναδικές διαφορές :

- 3 µg πεπτιδίων προ-συμπυκνώθηκαν με ροή 3 µL/min για 10 min χρησιμοποιώντας στήλη- παγίδα C18 (Acclaim PepMap100, 100µm x 2cm, Thermo Scientific)
- Τα πεπτιδία διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας γραμμική βαθμίδα από 4% B έως 40% B σε 460 min με ρυθμό ροής 300 nL/min.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) τεχνικές επαναλήψεις (technical replicates).

## 6.7 Πρωτόκολλο επεξεργασίας δεδομένων δείγματος βακτηριακής καλλιέργειας *C. rodentium*

- Διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση : Τα ακατέργαστα αρχεία (raw files) της φασματομετρίας μάζας πρωτεΐνης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πακέτο MaxQuant<sup>(93,115–119)</sup> (έκδοση 1.6.1.0). Η αναζήτηση σε αυτά τα ακατέργαστα αρχεία, που αντιστοιχούν στις 3 τεχνικές επαναλήψεις της βακτηριακής καλλιέργειας *C.rodentium*, πραγματοποιήθηκε έναντι της βάσης δεδομένων του πρωτεόματος αναφοράς *Citrobacter rodentium* (strain ICC168, FASTA canonical & isoform, 4.792 protein entries, 02/27/2018) του Uniprot<sup>(132)</sup>, ενώ οι υπόλοιπες ρυθμίσεις παραμένουν ίδιες με αυτές που έλαβαν χώρα και στα ακατέργαστα αρχεία των δεδομένων των δειγμάτων κοπράνων (περιγραφή παραπάνω).
- Η στρατηγική της στατιστικής ανάλυσης στο Perseus (έκδοση 1.6.1.3) ακολούθησε την εξής διαδικασία<sup>(122,123)</sup>:
  - 1) Loading: Επιλέγω, από το συνδυασμένο αρχείο (combined txt) που έδωσε ως αποτέλεσμα το MaxQuant, το αρχείο Protein Groups και διαλέγω τα LFQ intensities που θα χρησιμοποιήσω
  - 2) Filtering: Αφαιρώ τις τιμές που αντιστοιχούν σε a) only identified by site, b) reverse, c) potential contaminants
  - 3) Annotations: Χρησιμοποιώ για σχολιασμό/ονομασία των πρωτεϊνών βάση δεδομένων που αφορά το *Citrobacter rodentium*, καθώς και σχολιασμούς/ονομασίες από GOBP, GOMF, GOCC, KEGG.

- 4) Transformation: Οι τιμές των εντάσεων LFQ μετασχηματίζονται σε λογαριθμικές (Log2), (οι μηδενικές γίνονται NaN: not a number).
  - 5) Filtering: Φιλτράρισμα βασισμένο στις έγκυρες τιμές (based on valid values), όπου συγκρατούνται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν αριθμητικές τιμές έντασης LFQ και στις τρεις τεχνικές επαναλήψεις (δηλαδή απορρίπτονται οι πρωτεΐνες με τουλάχιστον μια τιμή NaN).
- Βιοπληροφορική ανάλυση: Καταλήγουμε, λοιπόν, σε λίστα πρωτεϊνών / γονιδίων (παράρτημα) με 897 καταχωρήσεις, όπου ταξινομούνται με βάση τους σχολιασμούς / ονομασίες GOBP, GOMF, GOCC, KEGG

## 7 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup> ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 7.1 Μελέτη πρωτεώματος του ξενιστή/ποντικού στην εντερική φλεγμονή συναρτήσκει της έκφρασης της πρωτεΐνης HuR

Ο ρόλος της πρωτεΐνης HuR αφορά στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού εναντίον της λοίμωξης. Για να μελετήσουμε το πρωτέωμα του ξενιστή/ποντικού στην κατάσταση της εντερικής φλεγμονής σε συνάρτηση με την έκφραση της HuR, η οποία σχετίζεται με την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια.

#### 7.1.1 Διαγονιδιακά ποντίκια

Για να μελετήσουμε το ρόλο της πρωτεΐνης HuR στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (IEC: Intestinal Epithelial Cells) και στα μυελοειδή κύτταρα (myeloid cells) χρησιμοποιήθηκαν δύο, ήδη παραγμένες και χαρακτηρισμένες, σειρές διαγονιδιακών ποντικών (conditional knockout mouse lines), οι οποίες είχαν δημιουργηθεί από τη διασταύρωση *VillinCre<sup>+</sup>* και *LysozymeCre<sup>+</sup>* διαγονιδιακών ποντικών με ποντίκια ομόλογα για το *HuR<sup>ff</sup> allele*<sup>(53,133)</sup>. Τα *VillinCre<sup>+</sup> HuR<sup>ff</sup>* και *LysozymeCre<sup>+</sup> HuR<sup>ff</sup>* ποντίκια θα αναφέρονται ως IEC-HuRko και M-HuRko αντίστοιχα. Οι *VillinCre-* και *LysozymeCre-* ποντικοί-σύζυγοι (littermates) χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου (control fl/fl).

Η *Villin* είναι μια πρωτεΐνη των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Τα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την Cre ρεκομπινάση υπό τον έλεγχο του προαγωγέα της *Villin*, σημαίνει ότι εκφράζουν την Cre στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Διασταυρώνοντας αυτά τα διαγονιδιακά ποντίκια με ποντίκια που το γονίδιο της HuR είναι πλαισιωμένο από αλληλουχίες flox (*HuR<sup>ff</sup>*) τότε στους απογόνους η HuR απενεργοποιείται μόνο στους απογόνους. Οι απόγονοι ενός διαγονιδιακού ποντικού είναι κατά 50% διαγονιδιακοί, άρα σε μια διασταύρωση {*VillinCre<sup>+</sup> X HuR<sup>ff</sup>*} δημιουργούνται 50% *VillinCre<sup>+</sup> HuR<sup>ff</sup>* ποντίκια (test mice) και 50% *VillinCre<sup>-</sup> HuR<sup>ff</sup>* ποντίκια (control). Το ίδιο ισχύει και για τα *LysozymeCre<sup>+</sup> HuR<sup>ff</sup>*, μόνο που σε αυτή την περίπτωση η Cre παράγεται στα κύτταρα της μυελικής σειράς.

Επίσης, στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν και διαγονιδιακά ποντίκια με γονότυπο Tg+, τα οποία υπερεκφράζουν την HuR υπό τον έλεγχο ενός καθολικού προαγωγέα. Non-Tg littermates (Tg- or Wt) χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου αντίστοιχα. [Τα διαγονιδιακά ποντίκια ελήφθησαν από το εργαστήριο του Ερευνητή Α' Δρ. Δημητρίου Κοντογιάννη, του τμήματος Ανοσολογίας του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».]

### 7.1.2 Μολύνσεις ποντικών με το βακτήριο *Citrobacter rodentium*

Μολύνθηκαν με το στέλεχος DBS100 του *C.rodentium* (ATCC 51459) διαγονιδιακά ποντίκια (ενότητα 7.1.1) ηλικίας 8 έως 12 εβδομάδων, όπως περιγράφεται στις μεθόδους (ενότητα 6.1). Για να μειωθεί η μετάδοση από ποντικό σε ποντικό, τα ποντίκια ήταν εγκλωβισμένα είτε σε μονάδες είτε σε δυάδες.

Δημιουργήθηκαν τρεις (3) διαφορετικές ομάδες (σετ) πειραμάτων, τα οποία θα αναφέρονται στην εργασία ως 1<sup>ο</sup> πείραμα (1<sup>st</sup> exp), 2<sup>ο</sup> πείραμα (2<sup>nd</sup> exp) και 3<sup>ο</sup> πείραμα (3<sup>rd</sup> exp). Η συλλογή των δειγμάτων κοπράνων πραγματοποιήθηκε και για διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρες) κατά τη διάρκεια της λοίμωξης στην κάθε ομάδα. Τα στοιχεία αυτά παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 7.1:** Δείγματα κοπράνων που συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν από κάθε ομάδα (σετ) πειραμάτων και οι χρονικές στιγμές (ημέρες)

1st exp day 10	2nd exp day 0	3rd exp day 0 & day 10
M-HuRko (lys 7235)	M-HuRko (lys 7271)	M-HuRko (lys 7496)
M-HuRko (lys 7239)	M-HuRko (lys 7276)	M-HuRko (lys 7524 )
M-HuRko (lys 7237 )	M-HuRko (lys 7430)	M-HuRko (lys 7525)
M-HuRko (lys 7238 )	Control ( fl/fl 7272)	M-HuRko (lys 14)
M-HuRko (lys 7240 )	Control ( fl/fl 7275)	Control ( fl/fl 7437)
Control (fl/fl 7310)	Control ( fl/fl 7278)	Control ( fl/fl 7440)
Control (fl/fl 7327)	Control ( fl/fl 7414)	Control ( fl/fl 7491)
Control (fl/fl 7319)	Control ( fl/fl 7418)	Control ( fl/fl 12)
Control (fl/fl 7324)	Control ( fl/fl 7419)	IEC-HuRko ( vill 7434)
Control (fl/fl 7326)	Control (fl/fl 7429)	IEC-HuRko ( vill 7436)
IEC-HuRko (vill 7313)	IEC-HuRko ( vill 7416)	IEC-HuRko ( vill 7501)
IEC-HuRko (vill 7315 )	IEC-HuRko ( vill 7417)	IEC-HuRko ( vill 7502)
IEC-HuRko (vill 7321)	Tg- ( wt 7283 )	Tg- ( wt 7491 )
IEC-HuRko (vill 7322)	Tg- ( wt 7285 )	Tg- (wt 7481)
Tg- (wt 7279 )	Tg- ( wt 7286 )	Tg- (wt 7532 )
Tg- (wt 7281)	Tg- ( wt 7426)	Tg- (wt 7533 )
Tg- (wt 7288)	Tg+ ( tg 7287)	Tg+ (tg 7427)
Tg- (wt 7337)	Tg+ ( tg 7289 )	Tg+ (tg 7425)
Tg- (wt 7338)	Tg+ ( tg 7489)	Tg+ (tg 7478)
Tg+ (tg 7282)		
Tg+ (tg 7290)		
Tg+ (tg 7335)		
Tg+ (tg 7280)		
Tg+ (tg 7284)		

### 7.1.3 Ανάλυση πρωτεώματος ξενιστή/ποντικού (host proteome analysis)

Όλα τα δείγματα κοπράνων δέχθηκαν επεξεργασία με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 6.2 και λήφθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, τα οποία υποβλήθηκαν σε διαδικασία πέψης.

Τα δείγματα του 1<sup>ου</sup> πειράματος ημέρα 10<sup>η</sup>, 2<sup>ου</sup> πειράματος ημέρα μηδέν (0) και 3<sup>ου</sup> πειράματος ημέρα 9<sup>η</sup> υποβλήθηκαν στη διαδικασία της FASP, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 6.2.1.1. Η μέθοδος FASP (Εικόνα 2.17) χρησιμοποιείται για την πέψη πρωτεϊνών με τη χρήση θρυψίνης επί φίλτρου πριν από την ανάλυση με φασματομετρία μάζας(71,74,75). Σχεδιάστηκε για την απομάκρυνση των απορρυπαντικών και των χαοτροπικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του δείγματος. Επιπλέον, η μέθοδος FASP απομακρύνει συστατικά όπως άλατα, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια. Μετέπειτα έκλουση και αφαλάτωση του πλούσιου σε πεπτιδία διαλύματος παρέχει ένα δείγμα έτοιμο για ανάλυση με LCMS/MS.

Τα δείγματα του 3<sup>ου</sup> πειράματος ημέρα μηδέν (0) υποβλήθηκαν στη διαδικασία του SP3(82), όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 6.2.1.2. Η μέθοδος προσφέρει μη-επιλεκτική σύνδεση των πρωτεϊνών βασιζόμενη στην παγίδευση πεπτιδίων και πρωτεϊνών στην υδρόφιλη επιφάνεια μαγνητικών σφαιριδίων. Η αφυδάτωση του πρωτεϊνικού διαλύματος προκαλεί την καθίζηση των πολυπεπτιδικών συσσωματωμάτων στην επιφάνεια των σφαιριδίων, από όπου η έκπλυση με κατάλληλο διαλύτη απομακρύνει τα μη-πολυπεπτιδικά στοιχεία. Η πέψη και εδώ γίνεται με θρυψίνη.

Ακολούθησε ανάλυση με τη χρήση nanoUHPLC-MS/MS (πρωτόκολλο ενότητα 6.3). Έπειτα, η ανάλυση συνεχίστηκε με το βιοπληροφορικό πρόγραμμα MaxQuant (πρωτόκολλο ενότητα 6.4.1).

- Τα δείγματα του 1<sup>ου</sup> πειράματος αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος MaxQuant, έναντι της βάσης δεδομένων του *Mus Musculus*.
- Τα δείγματα του 3<sup>ου</sup> πειράματος αναλύθηκαν μέσω του προγράμματος MaxQuant, έναντι της δημιουργημένης βάσης δεδομένων Galaxy685.
- Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Perseus πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (διαδικασία ενότητα 6.4.3) των δεδομένων που πάρθηκαν από το MaxQuant, και για τα δύο πειράματα.

Τα αποτελέσματα περιγράφονται παρακάτω.

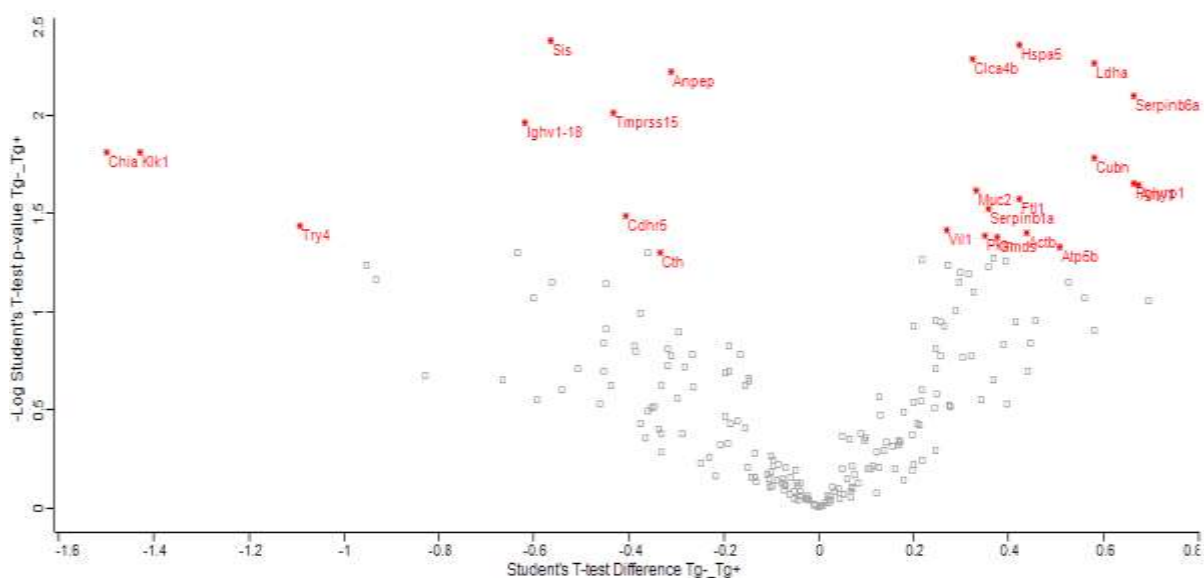
#### 7.1.3.1 Στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες

Εξάγονται διαγράμματα τύπου Volcano, όπως περιγράφεται στην ενότητα 6.4.3, διαδικασία Perseus, βήμα 9. Η εγγενής, αναμενόμενη τάση που έχουν

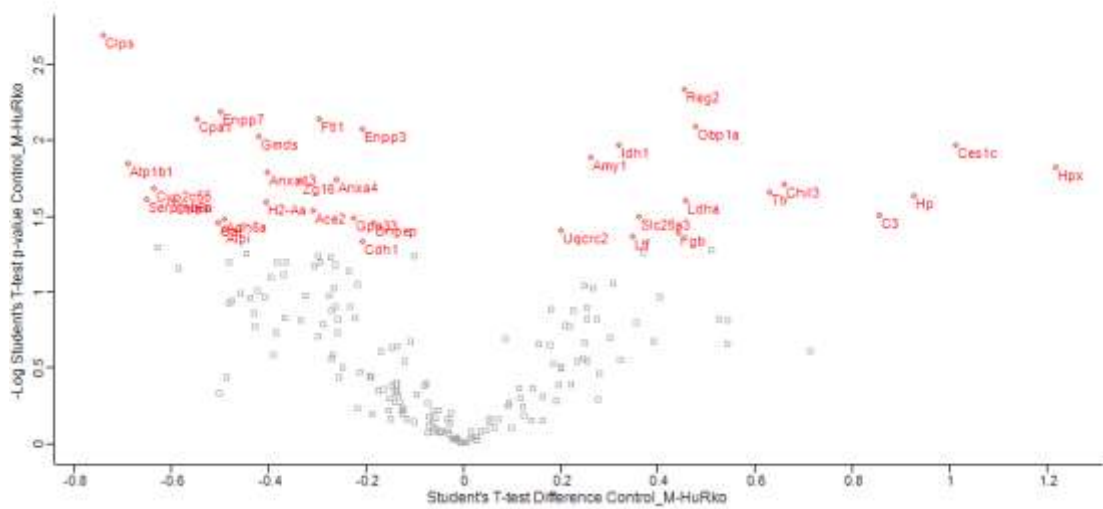
οι ακραίες τιμές  $\log_{10}FC$  να αντιστοιχούν σε μικρές τιμές p-value οδηγεί στο χαρακτηριστικό σχήμα που προσομοιάζει έναν κρατήρα ηφαιστείου. Με αυτόν τον τρόπο, όσο ψηλότερα στον κάθετο άξονα βρίσκεται ένα σημείο (μεγάλη τιμή αρνητικού λογαρίθμου του p-value) τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι η επαναληψιμότητα της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κάθε δείγμα στις βιολογικές επαναλήψεις, ενώ όσο πιο μακριά από το σημείο μηδέν (0) στον οριζόντιο άξονα, τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά στην ποσότητα της πρωτεΐνης μεταξύ των συγκρίσιμων ομάδων δειγμάτων κάθε φορά.

Για τη σύγκριση των δειγμάτων ανά δύο, δηλαδή είτε δύο διαφορετικών γονότυπων/ομάδων μεταξύ τους (π.χ. Control έναντι IEC-HuRko) είτε του ίδιου γονότυπου/ομάδας σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (π.χ. Control ημέρα 0 έναντι Control ημέρα διεξήχθησαν 'Two-sided Student t-tests' με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p-value  $\leq 0.05$  .

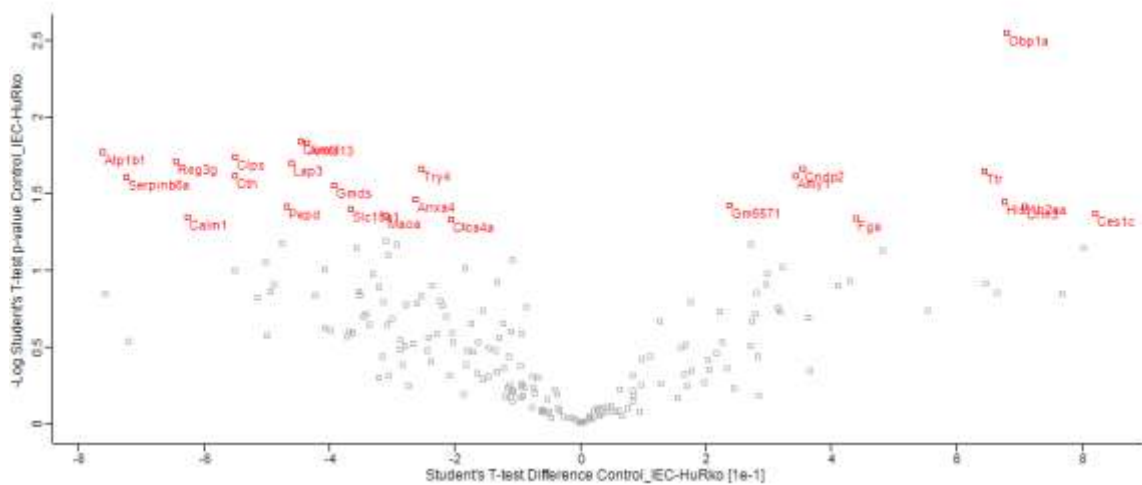
Όσον αφορά στο 1<sup>ο</sup> πείραμα πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων της 10<sup>ης</sup> ημέρας των ζευγαριών : Tg- vs Tg+, Control vs M-HuRko και Control vs IEC-HuRko, όπου και λάβαμε τις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες που φαίνονται και στα παρακάτω σχήματα. Με κόκκινο επισημαίνονται οι πρωτεΐνες/γονίδια που είναι στατιστικά σημαντικές (p-value  $\leq 0.05$ ).



**Σχήμα 7.1:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπραντα ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.



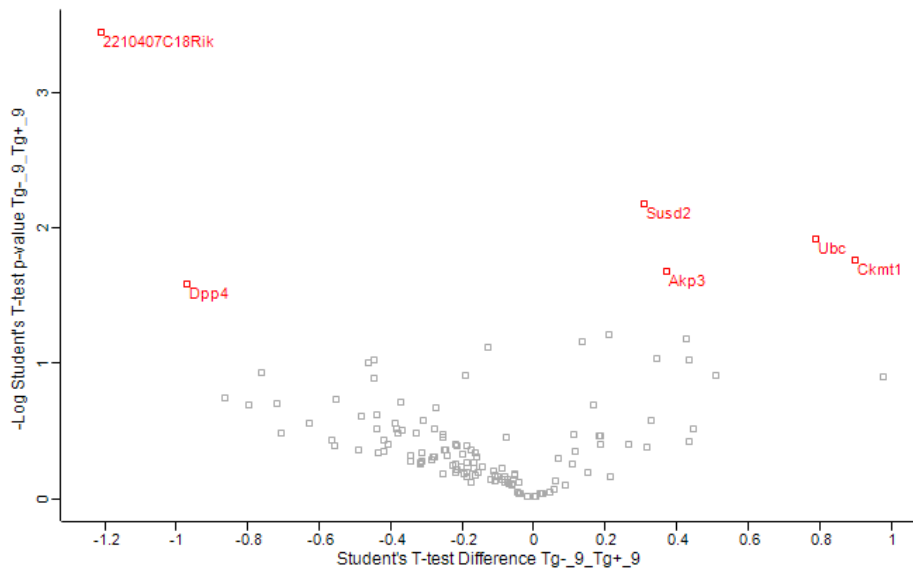
**Σχήμα 7.2:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και M-HuRko.



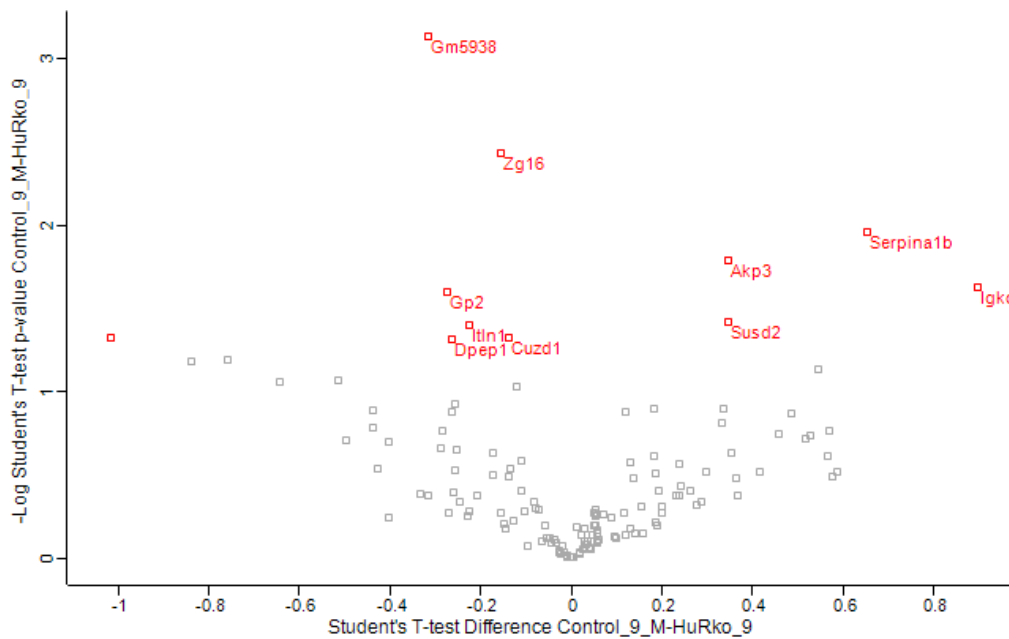
**Σχήμα 7.3:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και IEC-HuRko.

Στη συνέχεια, όσον αφορά στο 3<sup>ο</sup> πείραμα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των βιολογικών επαναλήψεων της 9<sup>ης</sup> ημέρας των ζευγαριών: Tg- vs Tg+, Control vs M-HuRko και Control vs IEC-HuRko, όπου και λάβαμε τις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες που φαίνονται και στα παρακάτω σχήματα. Με κόκκινο επισημαίνονται οι πρωτεΐνες/γονίδια που είναι στατιστικά σημαντικές ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ).

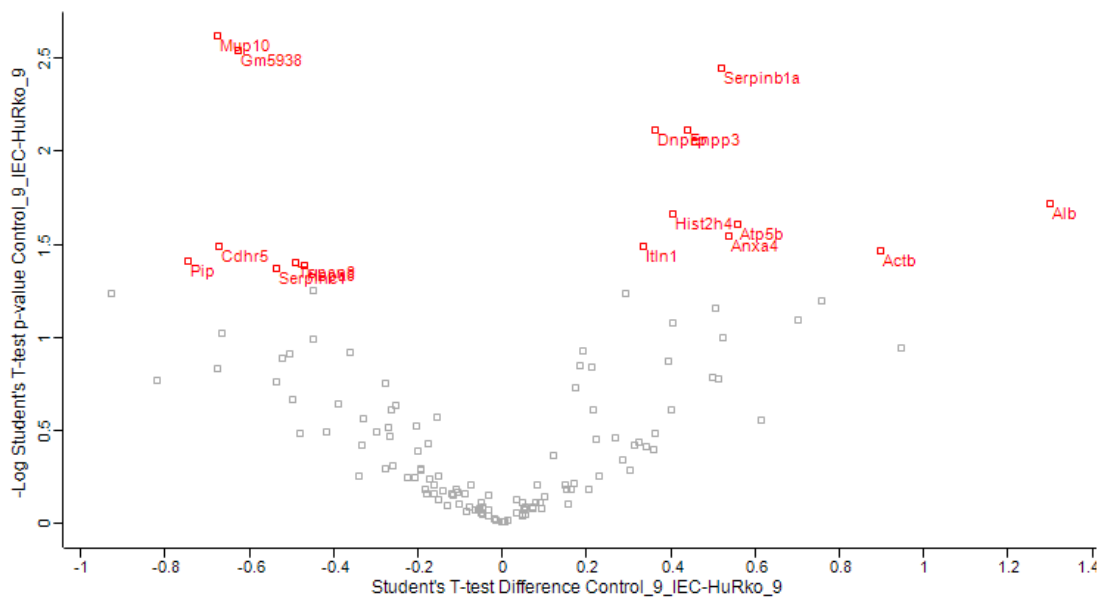




**Σχήμα 7.4:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.

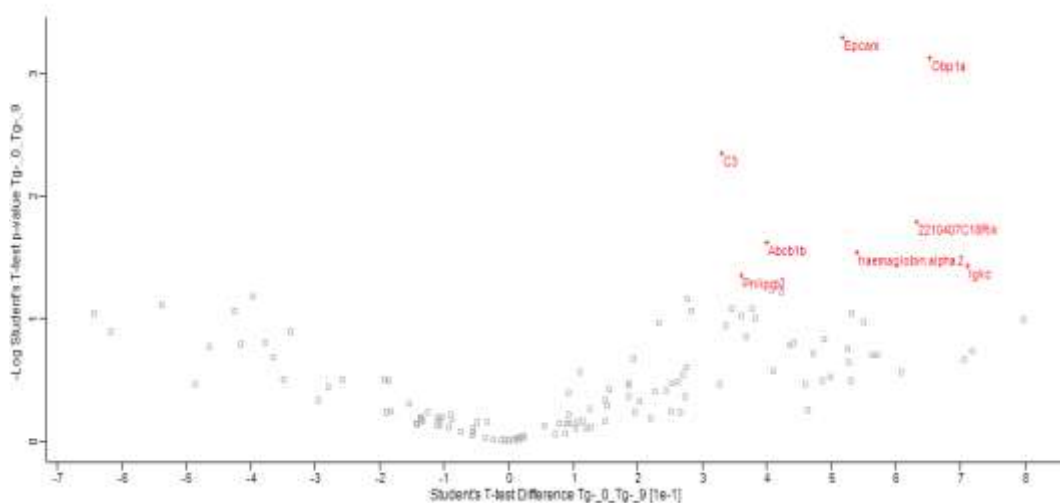


**Σχήμα 7.5:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και M-HuRko.



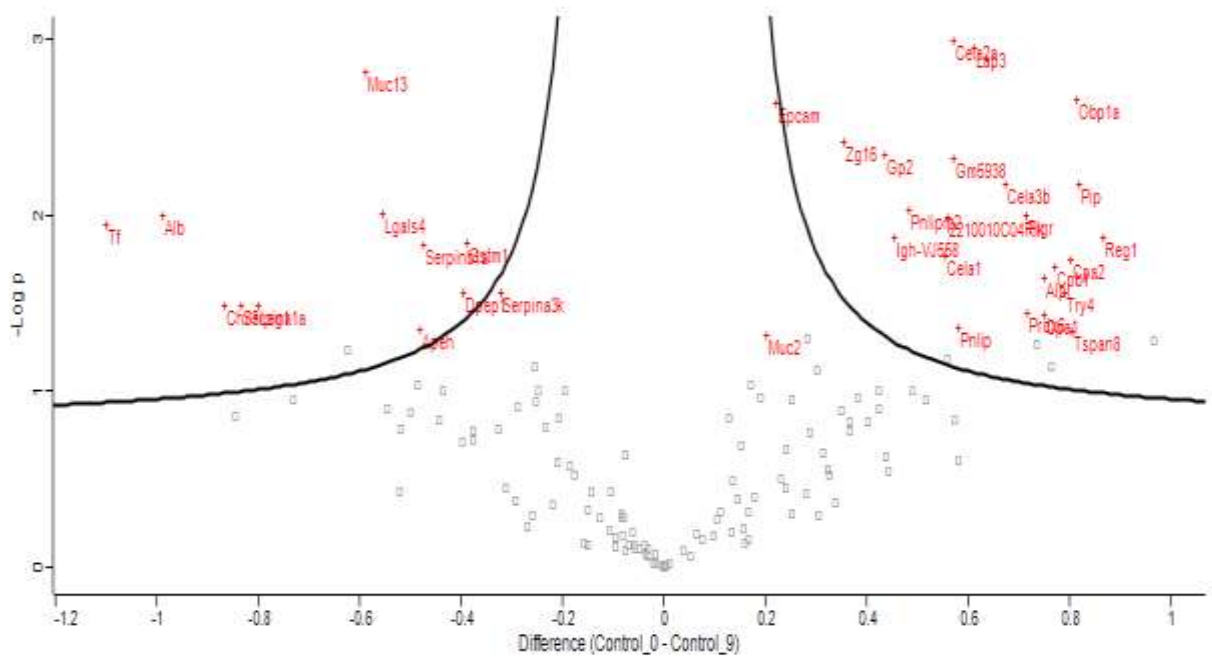
**Σχήμα 7.6:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπους Control και IEC-HuRko.

Επιπρόσθετα, στο 3<sup>ο</sup> πείραμα πραγματοποιήθηκε και σύγκριση μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, δηλαδή μεταξύ ημέρας 0 και ημέρας 9, για τον κάθε γονότυπο/ομάδα ξεχωριστά. Λάβαμε τις στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες που φαίνονται στα παρακάτω σχήματα. Με κόκκινο επισημαίνονται οι πρωτεΐνες/γονίδια που είναι στατιστικά σημαντικές ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ).

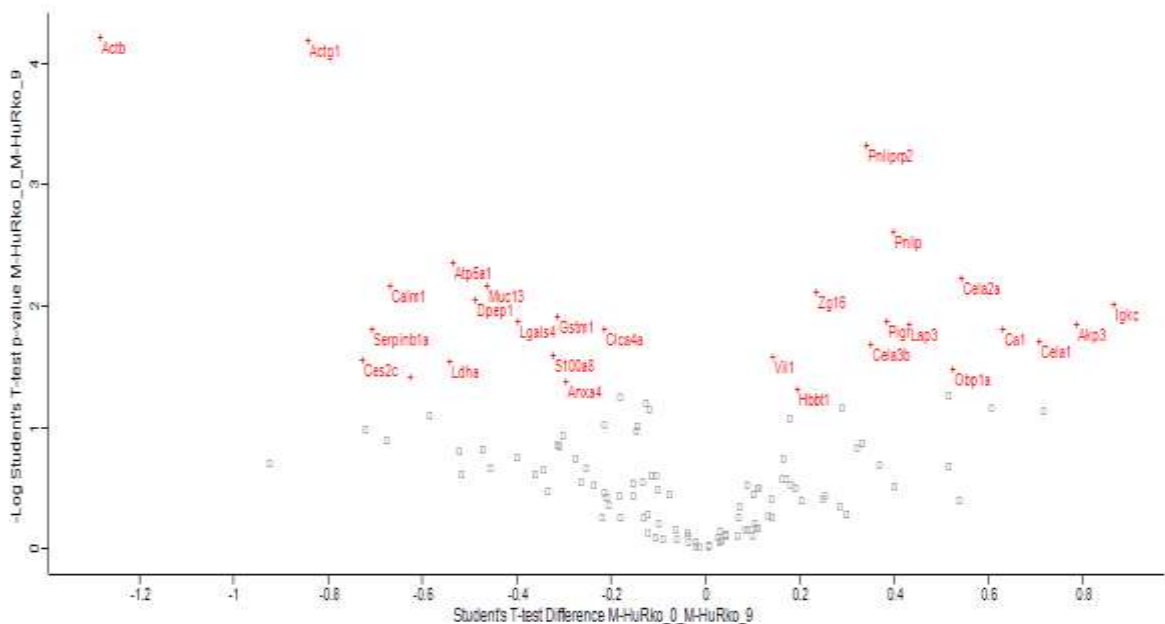


**Σχήμα 7.7:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg-, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

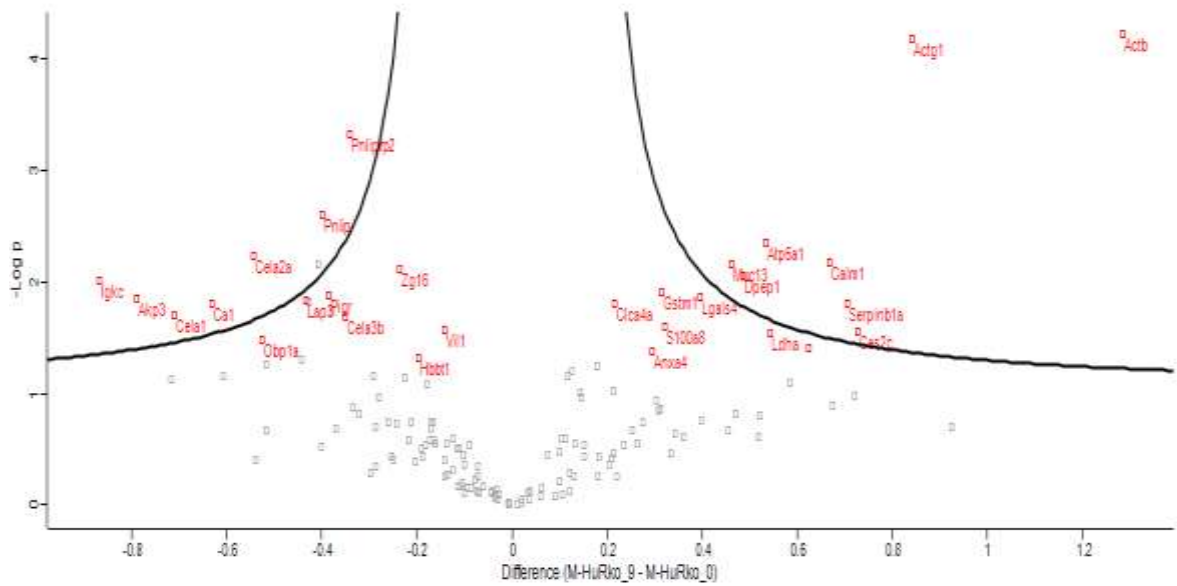




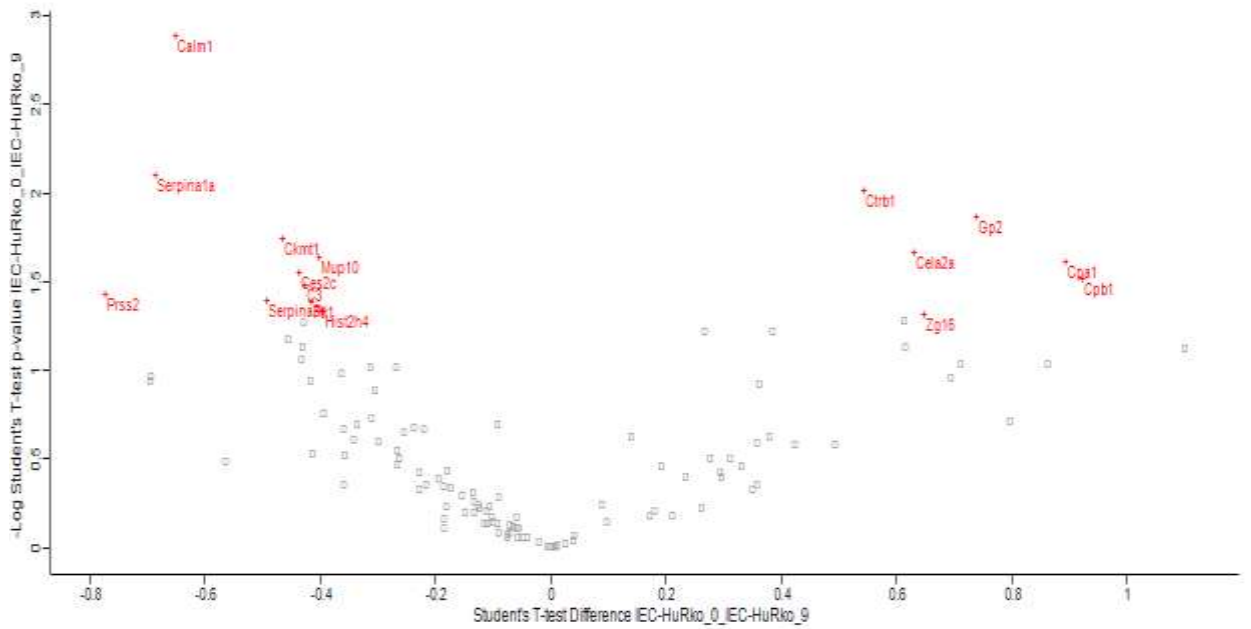
**Σχήμα 7.10:** Διάγραμμα Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9). Με τις καμπύλες διαχωρίζονται οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες/γονίδια με τιμές κατωφλίων  $FDR \leq 0.05$ ,  $\log_{10}FC \leq -0.38$  ή  $\log_{10}FC \geq +0.35$ , και  $-\text{Log}p \geq 1.33$ .



**Σχήμα 7.11:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).



**Σχήμα 7.12:** Διάγραμμα Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9). Με τις καμπύλες διαχωρίζονται οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες/γονίδια με τιμές κατωφλίων  $FDR \leq 0.05$ ,  $\log_{10}FC \leq -0.34$  ή  $\log_{10}FC \geq +0.46$  και  $-\text{Log } p > 1.55$ .

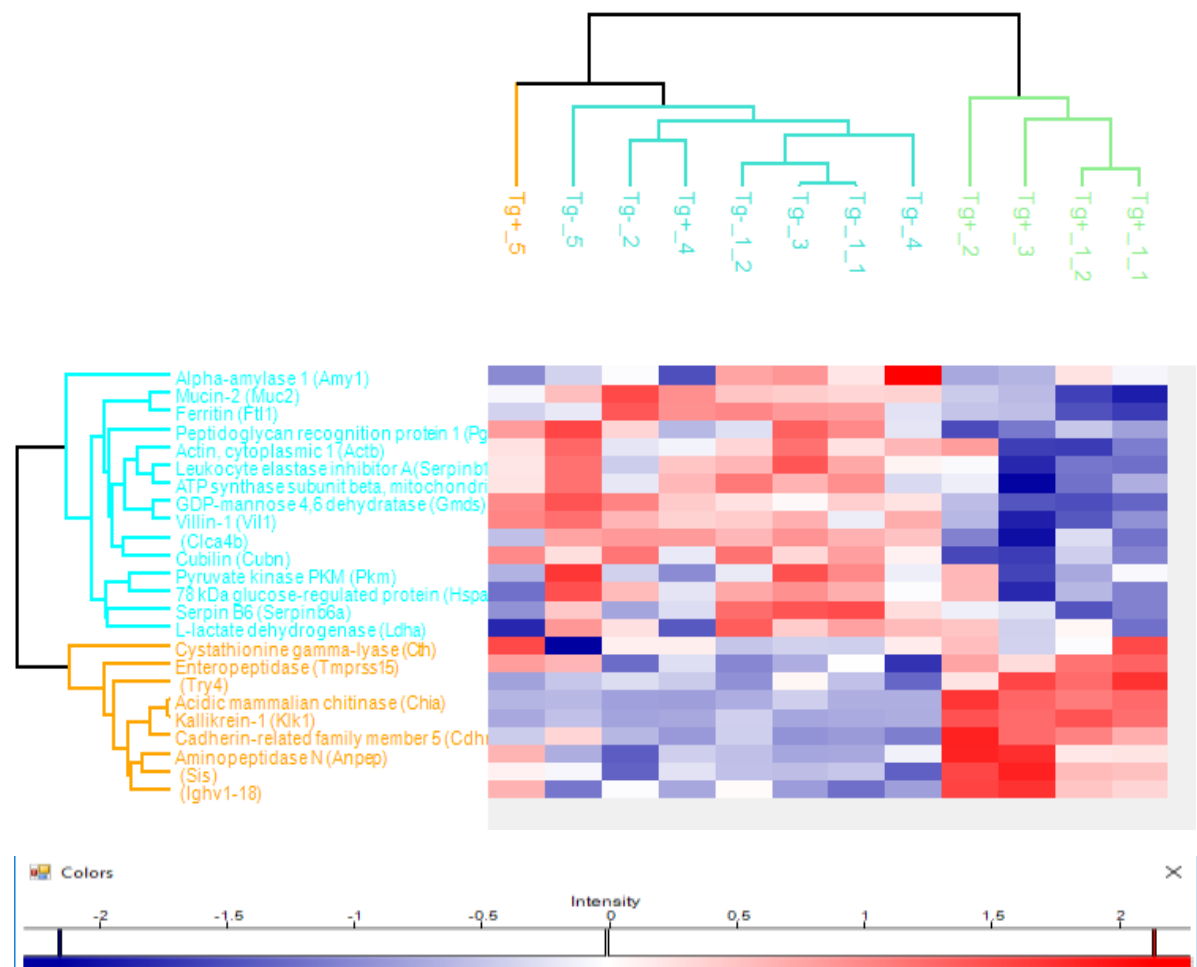


**Σχήμα 7.13:** Διάγραμμα τύπου Volcano, που αναπαριστά τη σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρινα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, IEC-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

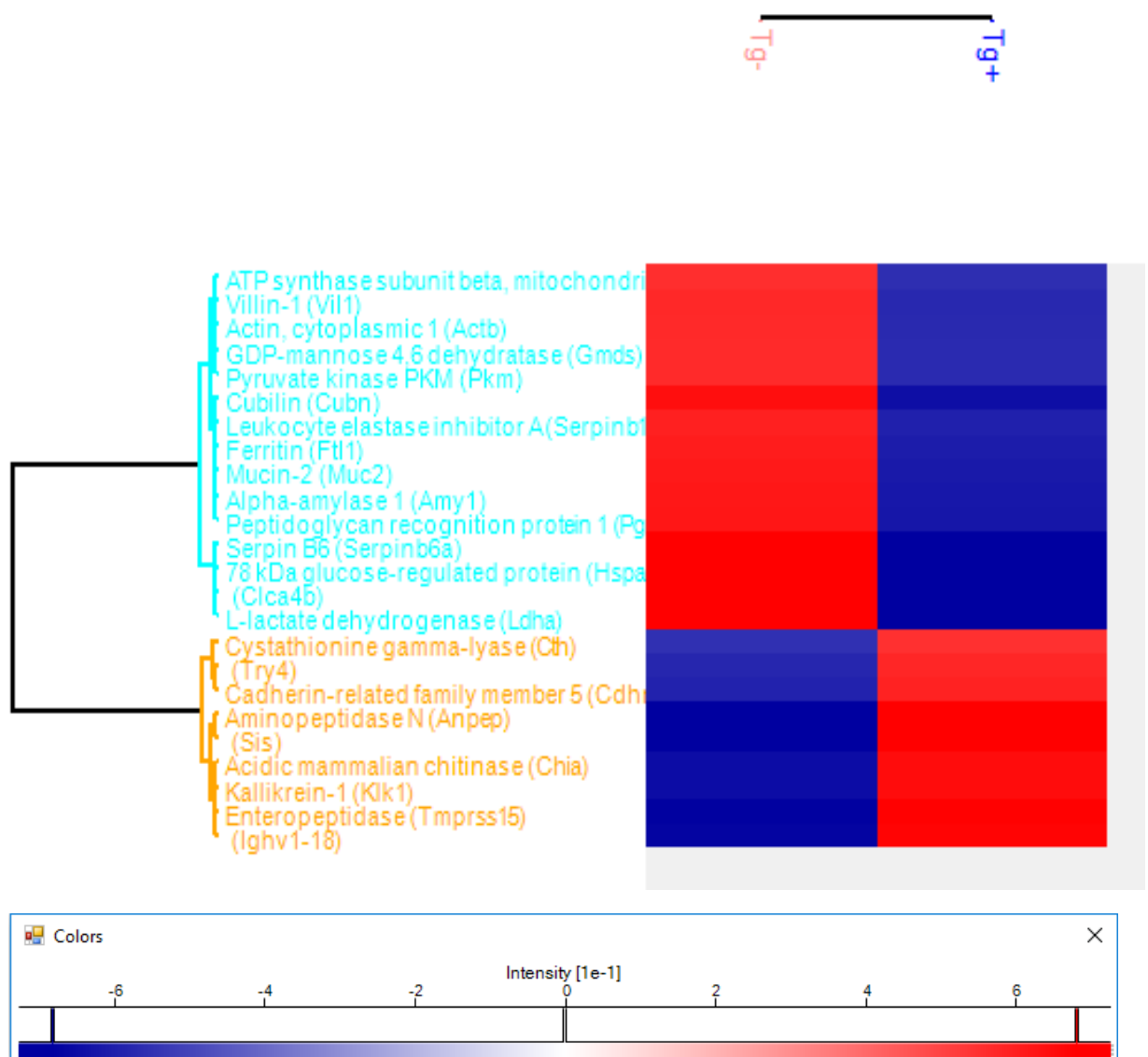
### 7.1.3.2 Ομαδοποίηση και έκφραση των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών

Εκτελώντας ιεραρχική ομαδοποίηση (hierarchical clustering) εξάγουμε θερμικούς χάρτες (βλέπε ενότητα 6.4.3, Perseus βήματα 12, 13, 14, 15), όπου παρουσιάζονται η «υπερ-έκφραση» ↑ (up-regulation) ή/και «υπο-έκφραση» ↓ (down-regulation) τις κάθε στατιστικά σημαντικής πρωτεΐνης σχετικά (relatively) με τις ομάδες/γονότυπους που έρχονται σε σύγκριση κάθε φορά, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

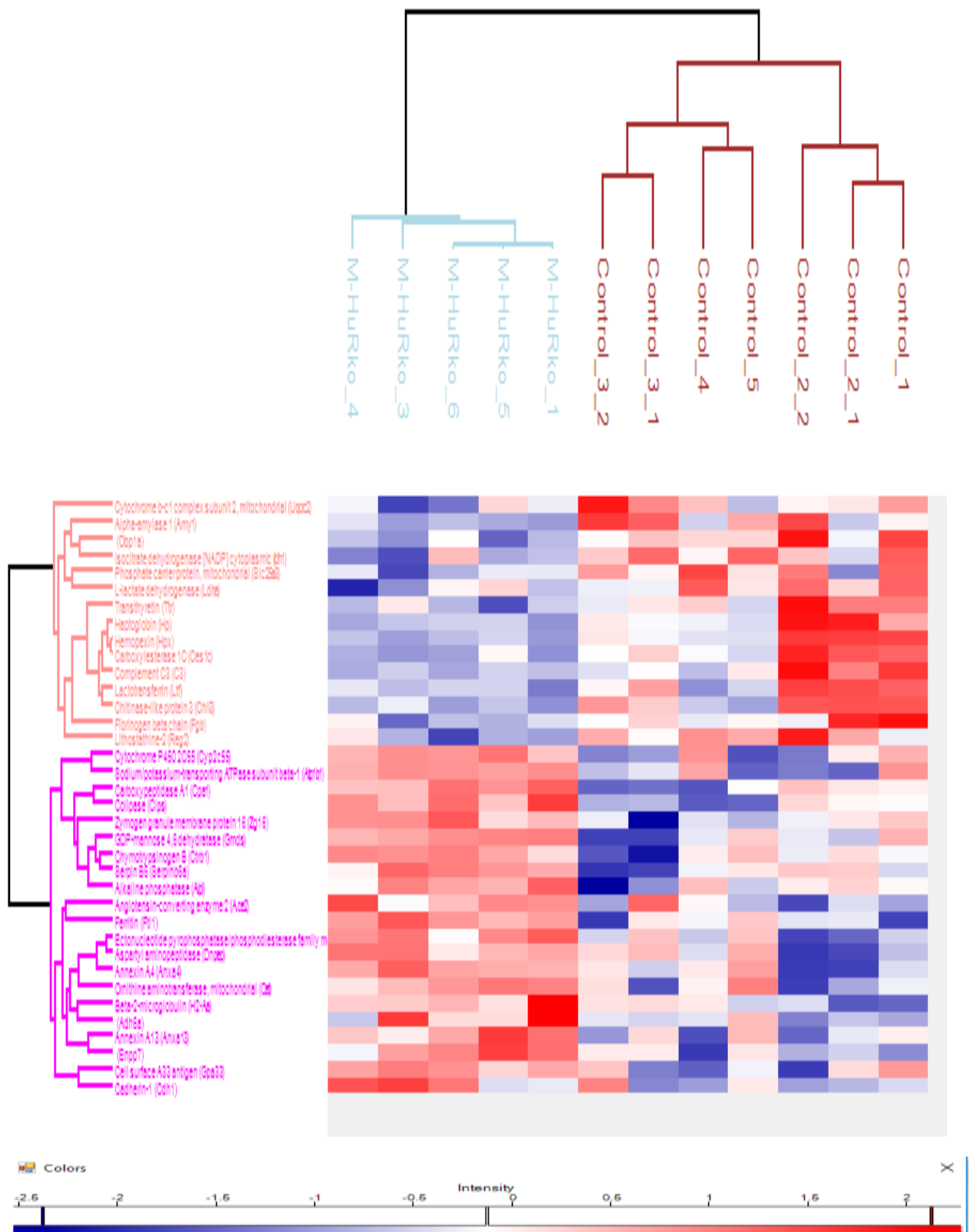
Οι θερμικοί χάρτες που αντιπροσωπεύουν το 1<sup>ο</sup> πείραμα μαζί με τις αντίστοιχες κλίμακες τους, οι οποίες παρουσιάζουν τις διαβαθμίσεις στις αποχρώσεις συναρτήσει της τιμής της έντασης, ακολουθούν παρακάτω. Με κόκκινο επισημαίνονται όσες πρωτεΐνες υπερ-εκφράζονται, ενώ με μπλε όσες υπο-εκφράζονται, στα αντίστοιχα δείγματα.



**Εικόνα 7.1.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.1, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρωνα ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.

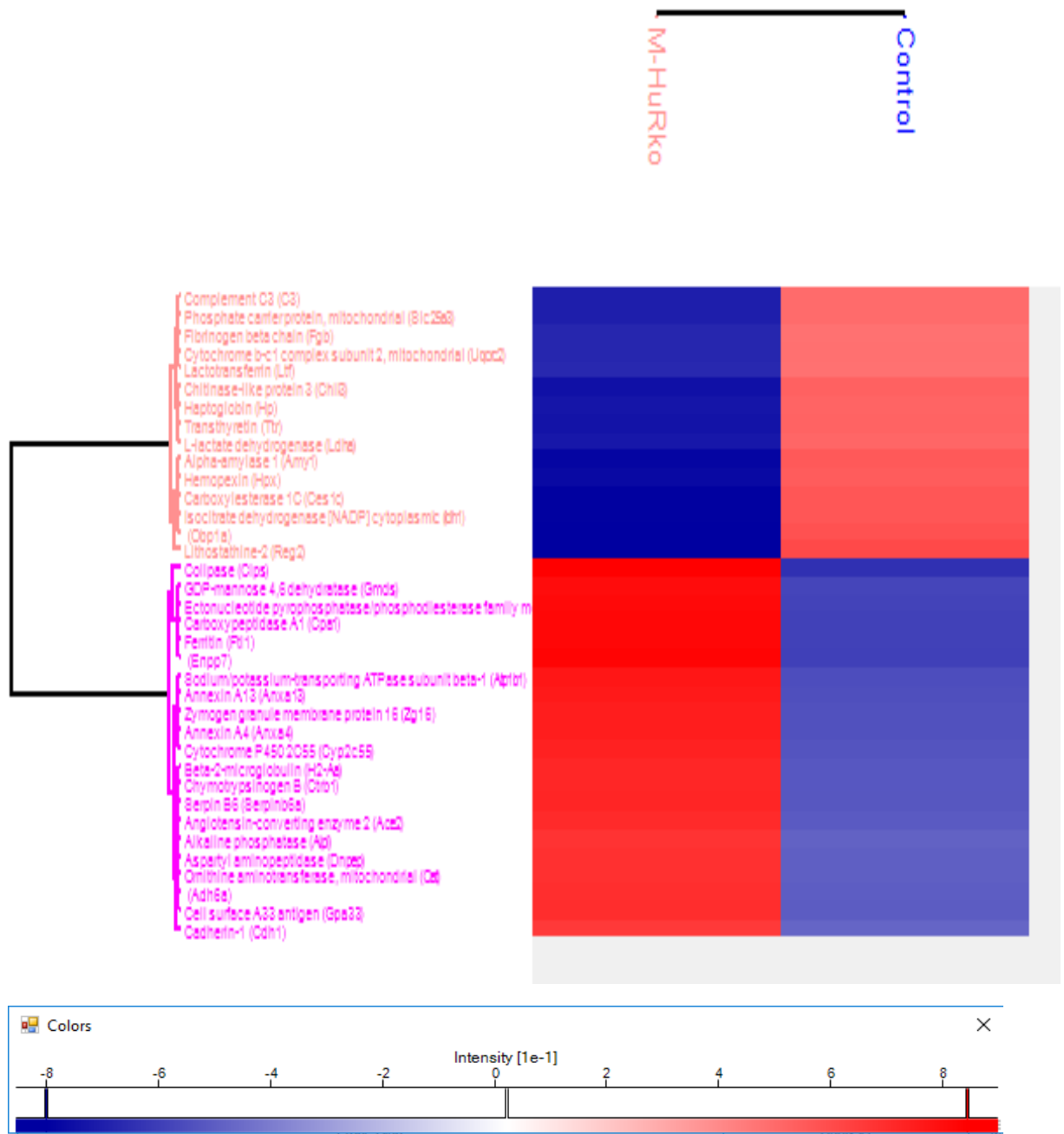


**Εικόνα 7.1.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.1, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, Tg- και Tg+ (1<sup>st</sup> exp, day 10, Tg- vs Tg+).

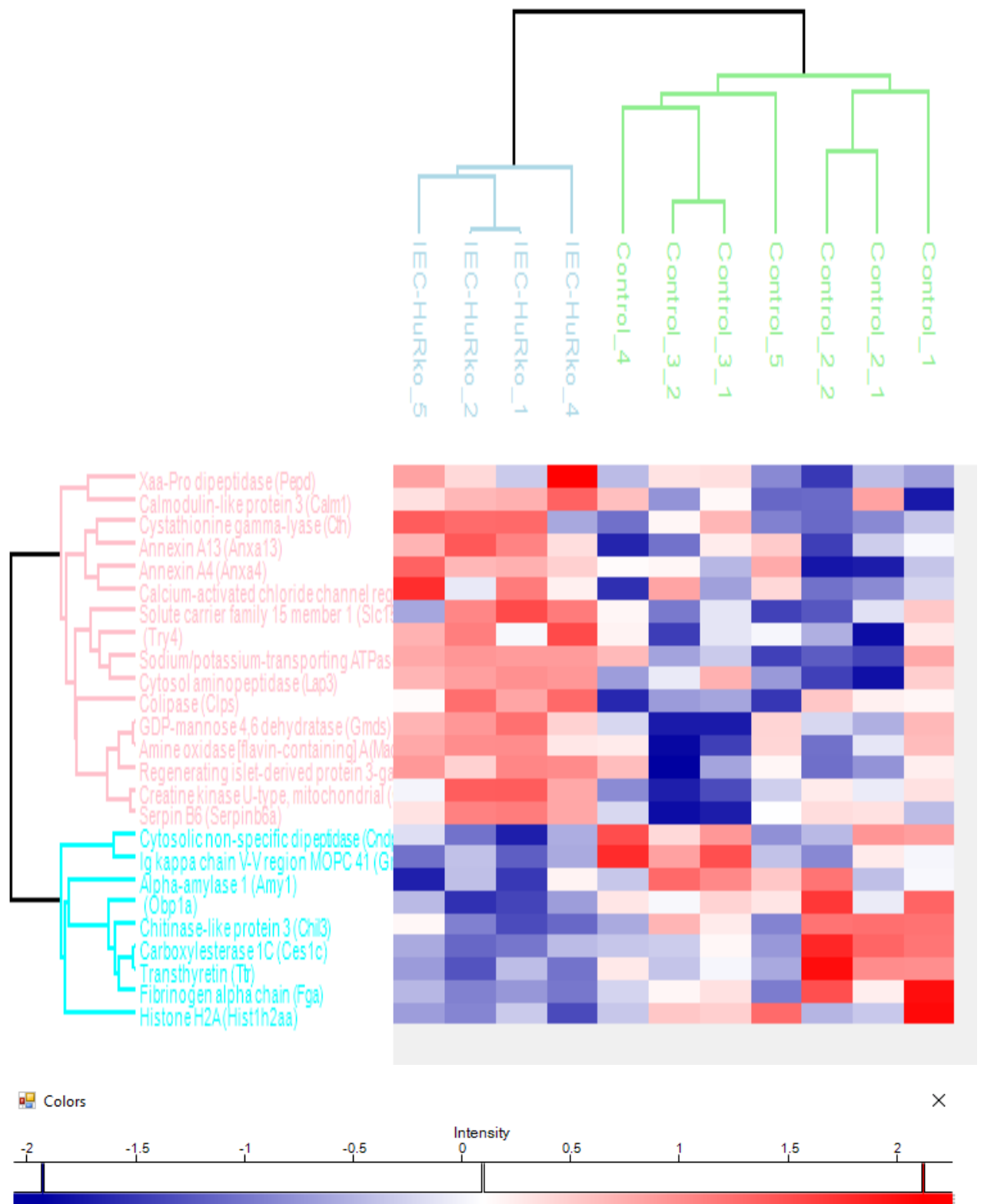


**Εικόνα 7.2.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.2, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπρινα ποντικών με γονότυπο/ομάδα M-HuRko και Control.

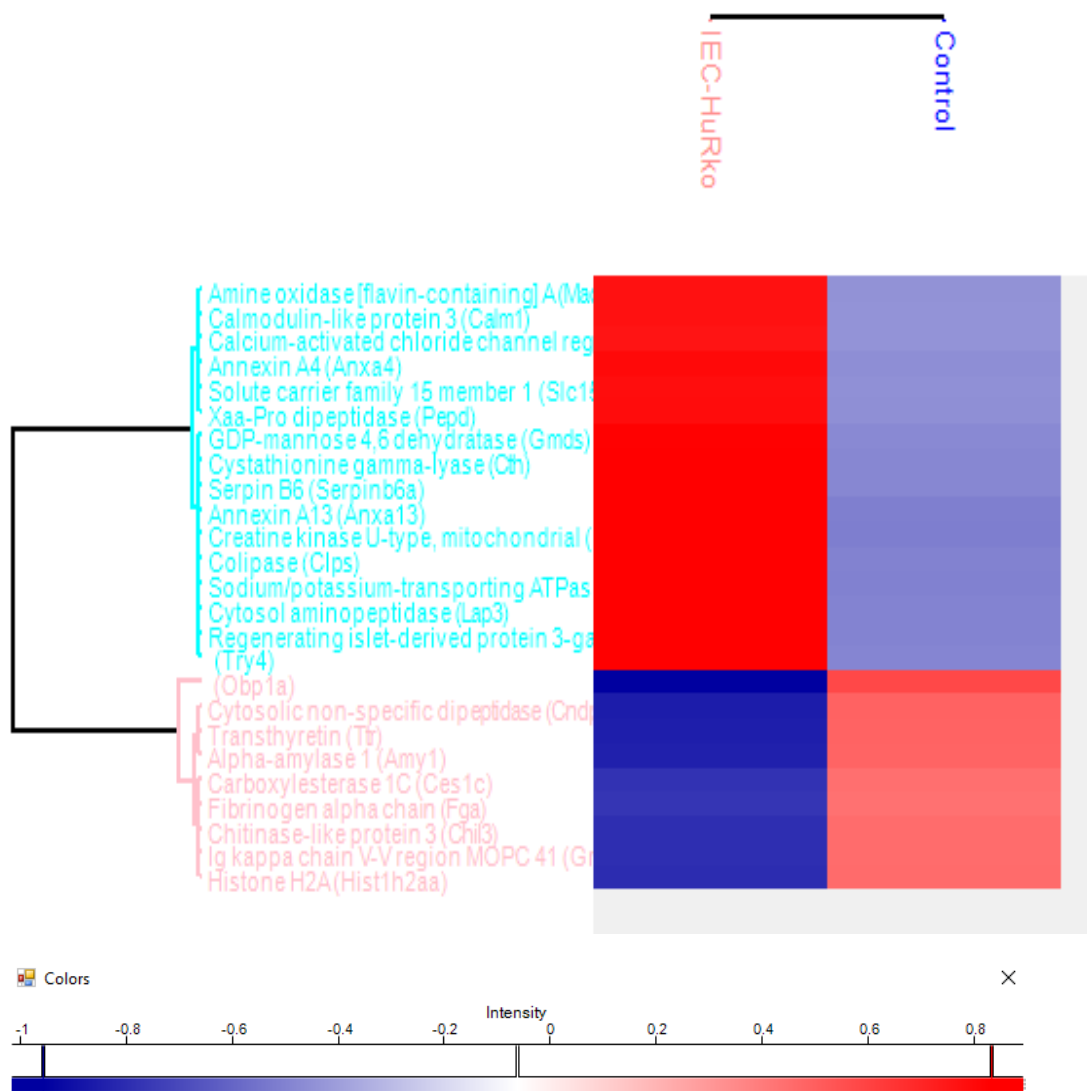




**Εικόνα 7.2.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.2, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, M-HuRko και Control (1<sup>st</sup> exp, day 10, M-HuRko vs Control).

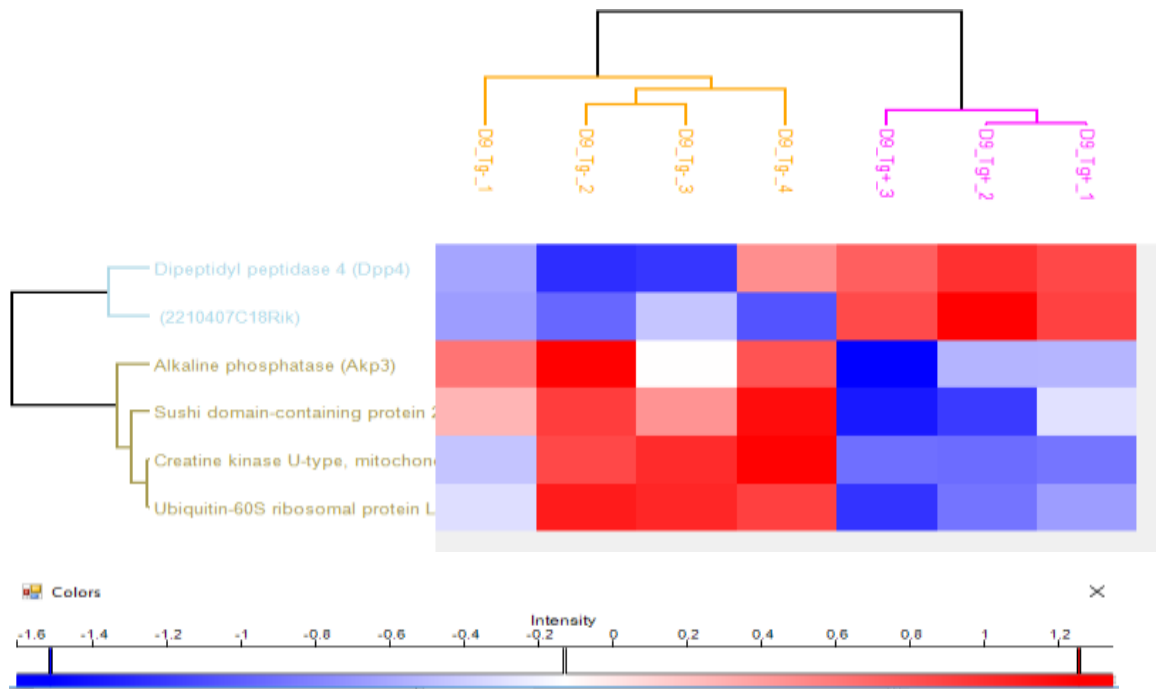


**Εικόνα 7.3.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.3, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 1<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 10<sup>η</sup>), από κόπραννα ποντικών με γονότυπους IEC-HuRko και Control.

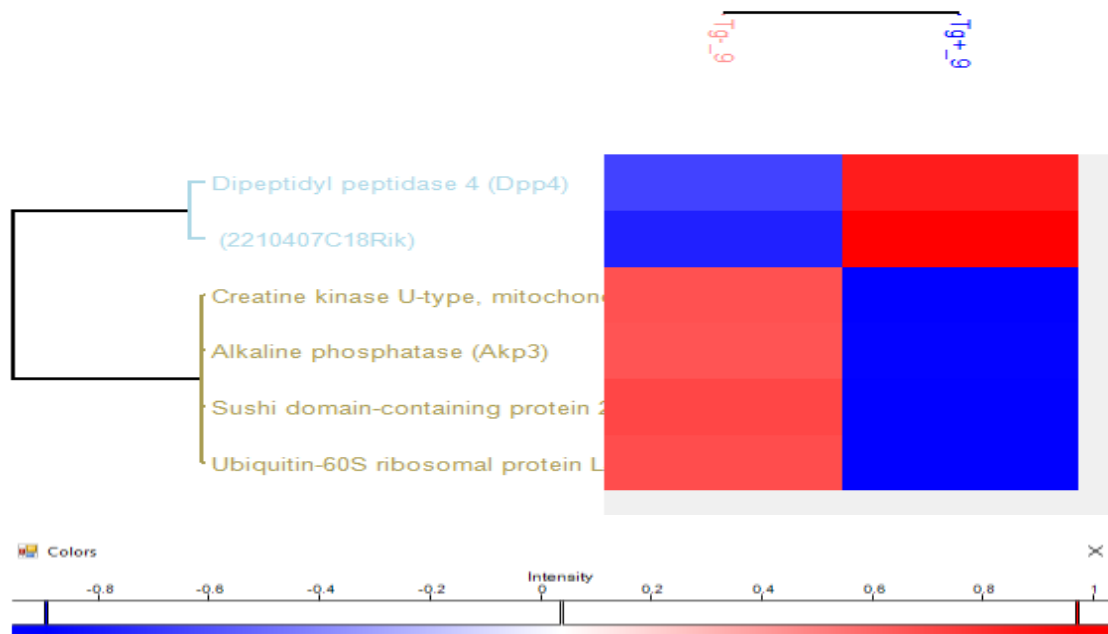


**Εικόνα 7.3.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.3, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, IEC-HuRko και Control (1<sup>st</sup> exp, day 10, IEC-HuRko vs Control).

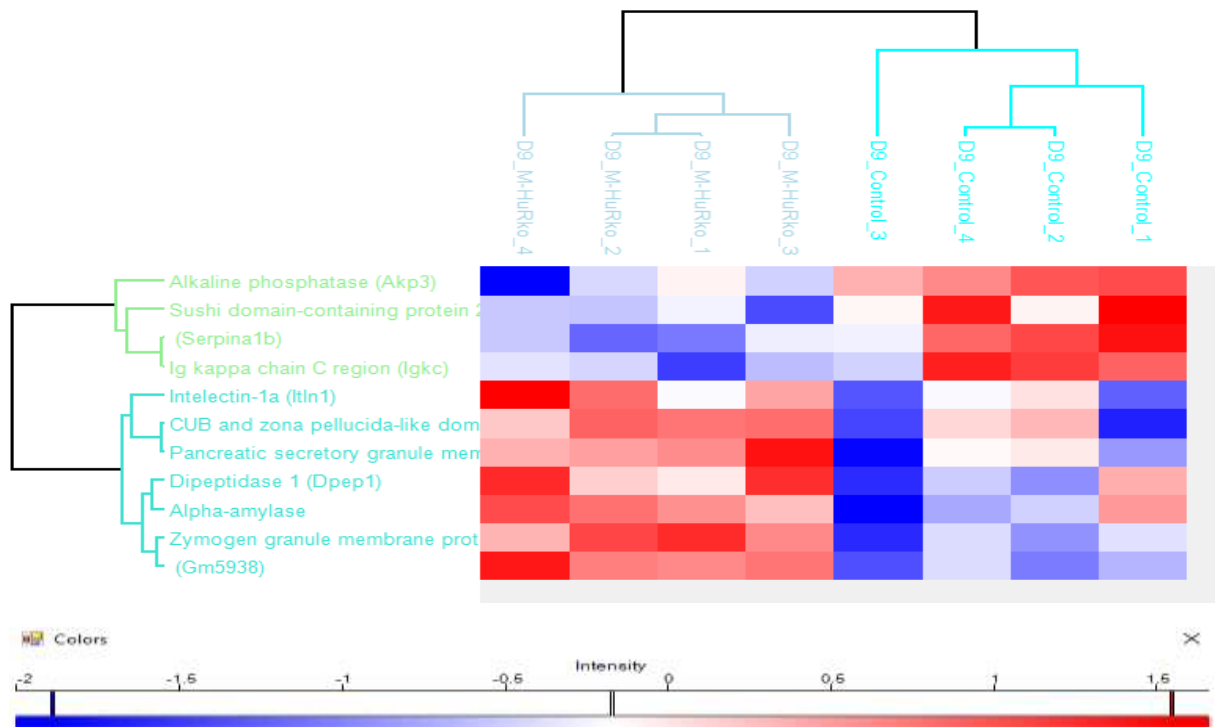
Οι θερμικοί χάρτες που αντιπροσωπεύουν το 3<sup>ο</sup> πείραμα μαζί με τις αντίστοιχες κλίμακες τους, οι οποίες παρουσιάζουν τις διαβαθμίσεις στις αποχρώσεις συναρτήσεως της τιμής της έντασης, ακολουθούν παρακάτω. Με κόκκινο επισημαίνονται όσες πρωτεΐνες υπερ-εκφράζονται, ενώ με μπλε όσες υπο-εκφράζονται, στα αντίστοιχα δείγματα.



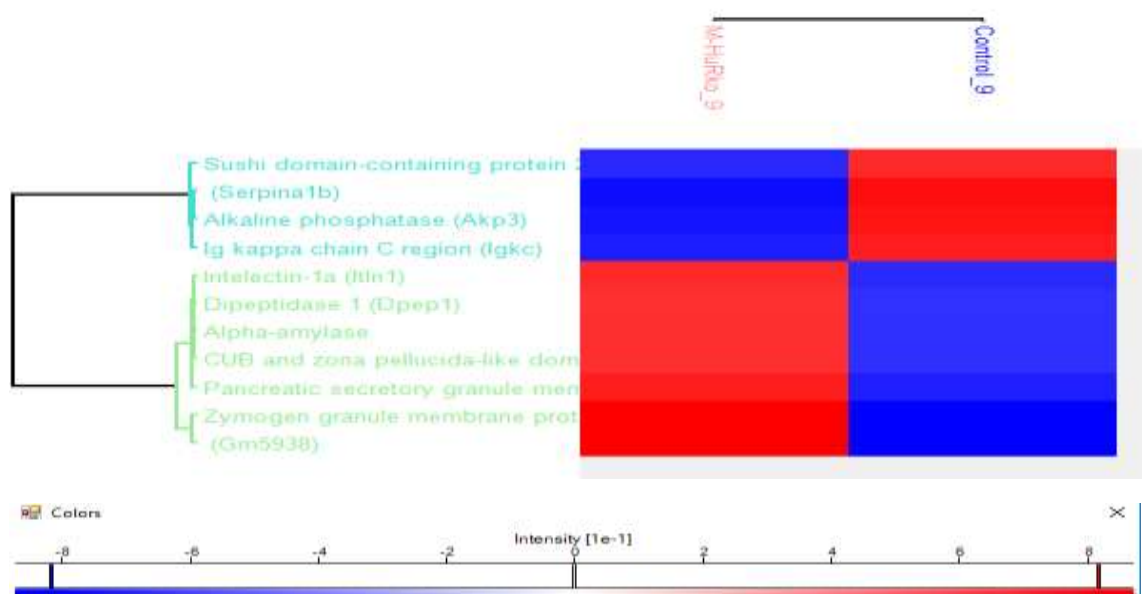
**Εικόνα 7.4.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.4, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρωνα ποντικών με γονότυπους Tg- και Tg+.



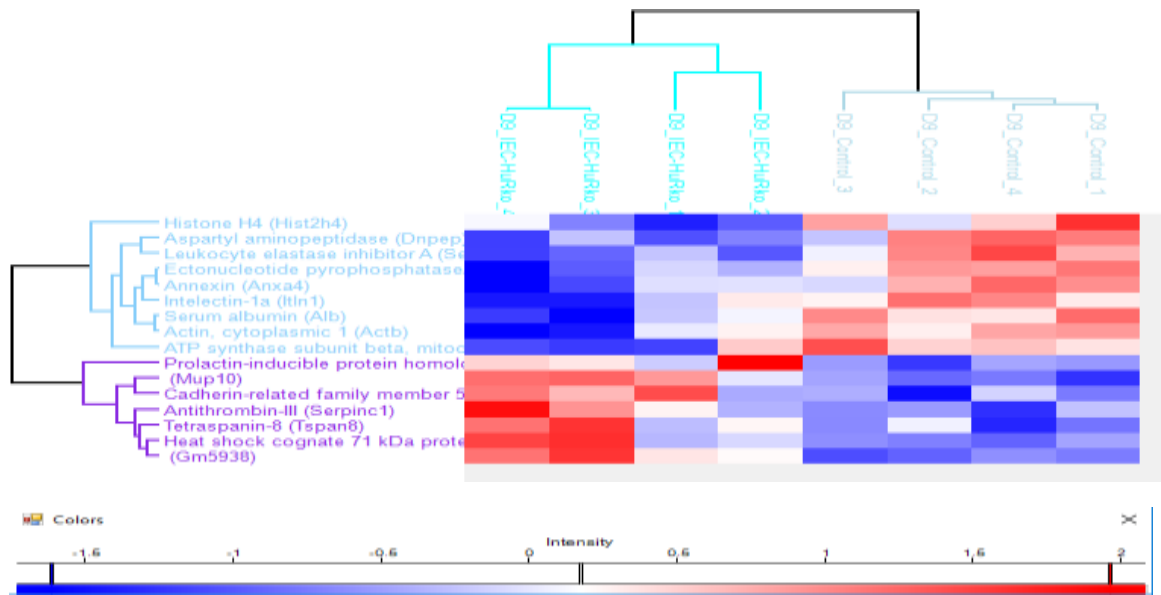
**Εικόνα 7.4.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.4, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, Tg- και Tg+ (3<sup>rd</sup> exp, day 9, Tg- vs Tg+).



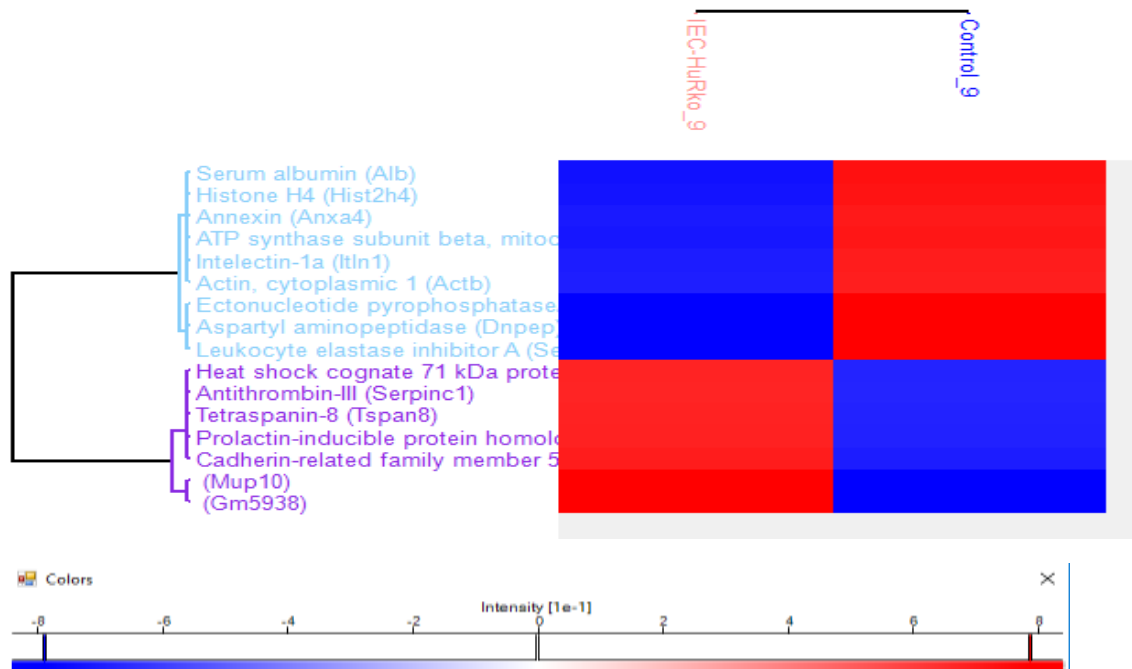
**Εικόνα 7.5.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.5, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρωνα ποντικών με γονότυπους M-HuRko και Control.



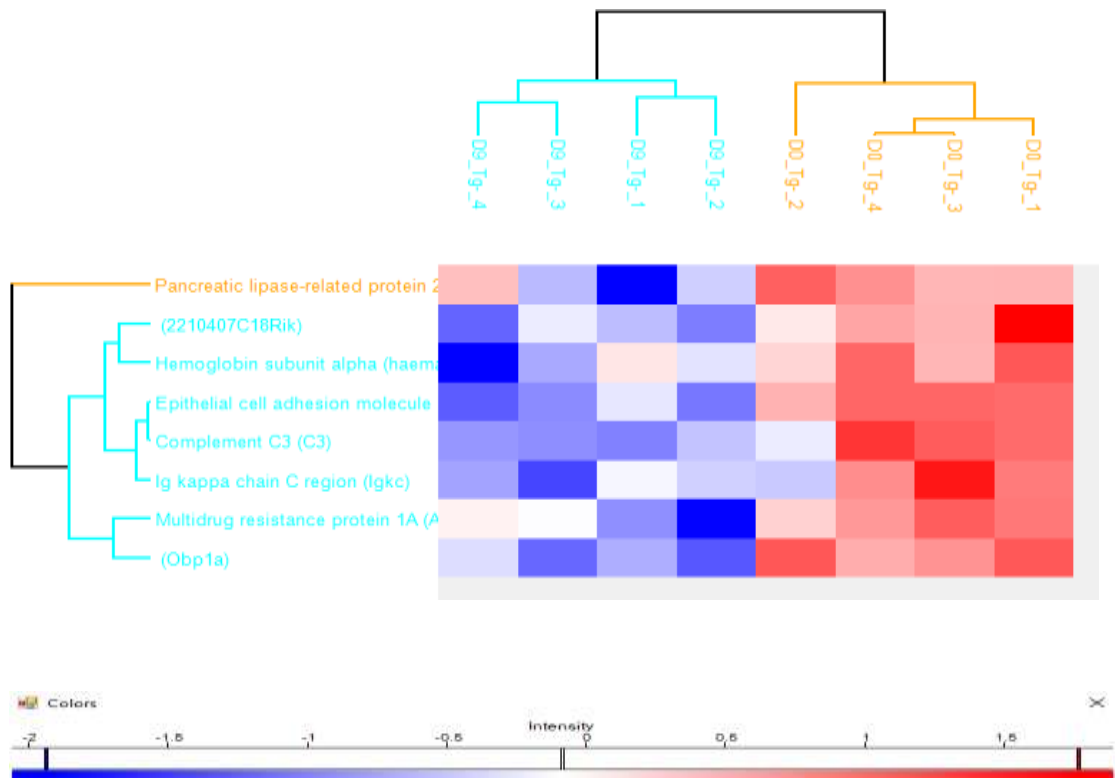
**Εικόνα 7.5.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.5, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, M-HuRko και Control (3<sup>rd</sup> exp, day 9, M-HuRko vs Control).



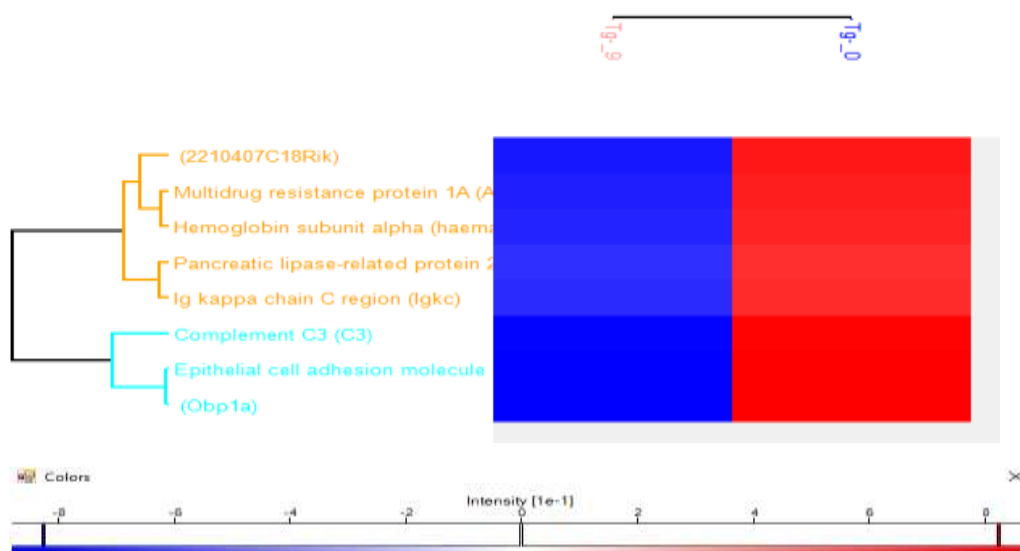
**Εικόνα 7.6.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.6, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, του 3<sup>ου</sup> πειράματος (ημέρα 9<sup>η</sup>), από κόπρωνα ποντικών με γονότυπους/ομάδα IEC-HuRko και Control.



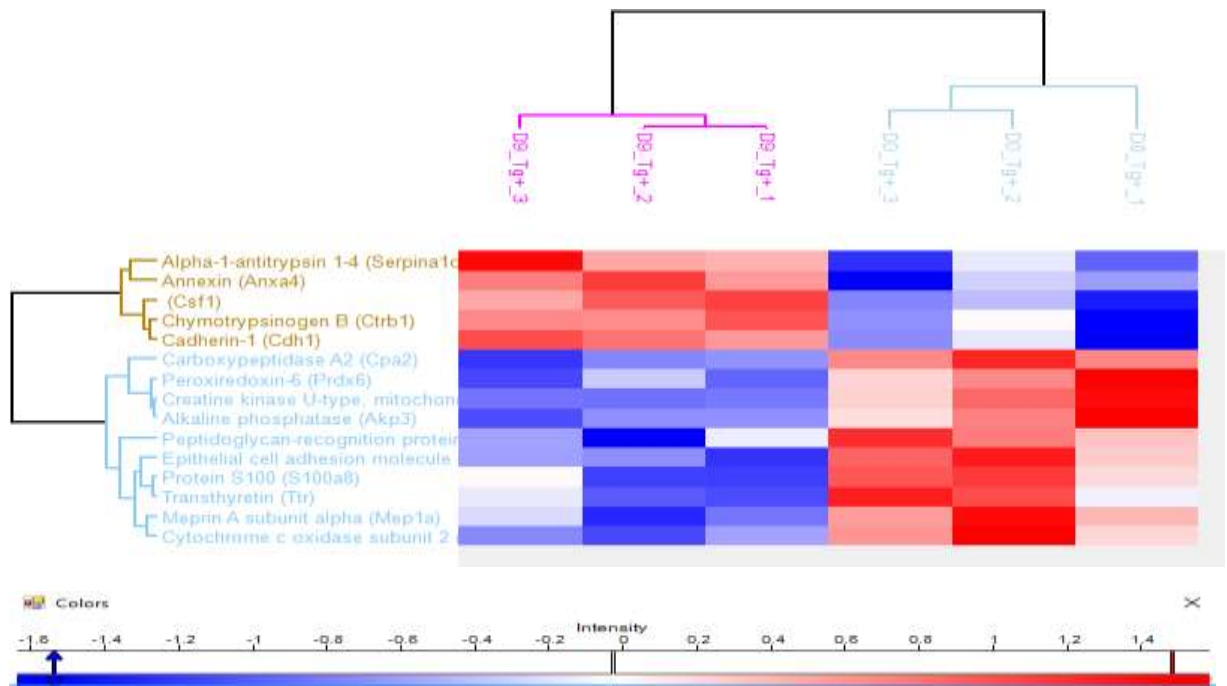
**Εικόνα 7.6.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.6, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων για κάθε γονότυπο/ομάδα, IEC-HuRko και Control (3<sup>rd</sup> exp, day 9, IEC-HuRko vs Control).



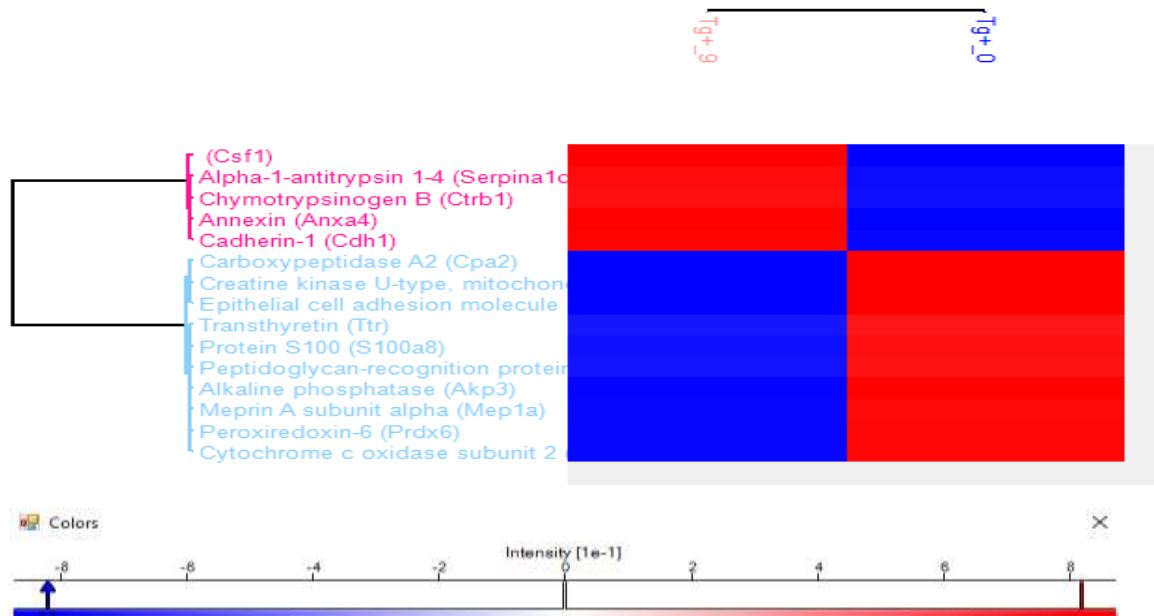
**Εικόνα 7.7.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.7, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρωνα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg-, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).



**Εικόνα 7.7.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.7, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, Tg-, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, Tg- day0 vs Tg- day9)

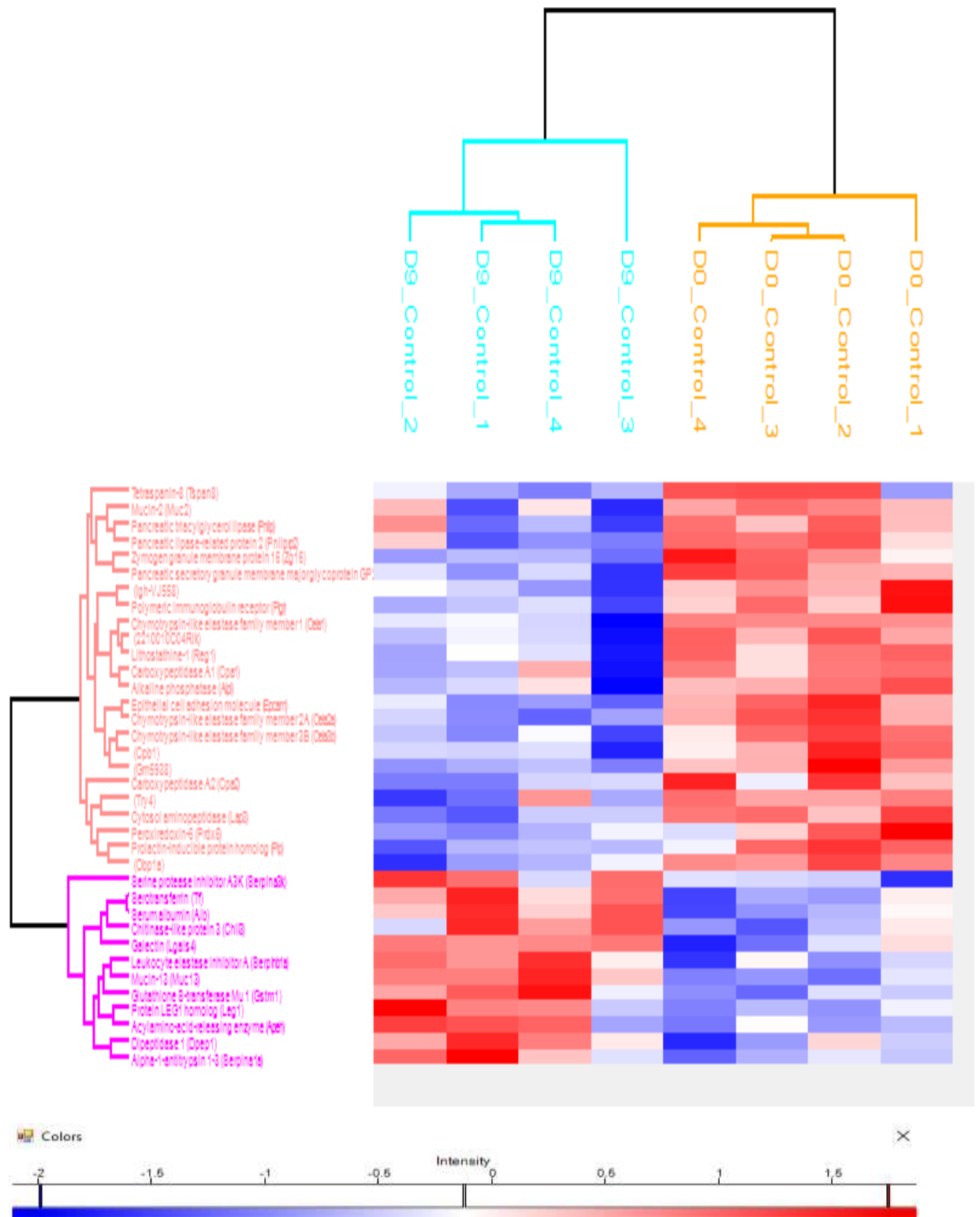


**Εικόνα 7.8.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.8, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρωνα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, Tg+, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).

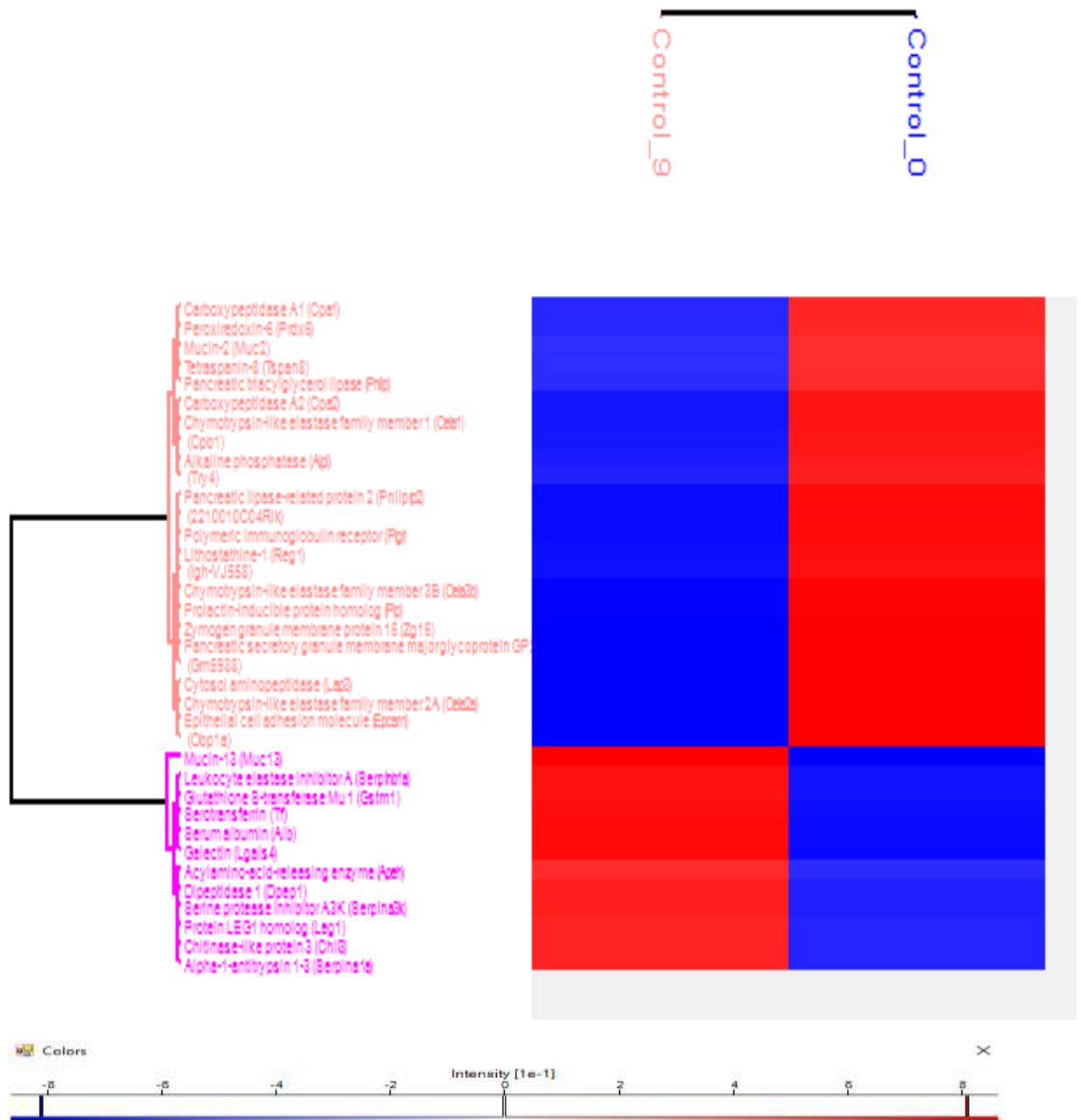


**Εικόνα 7.8.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.8, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, Tg+ , σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, Tg+ day0 vs Tg+ day9).

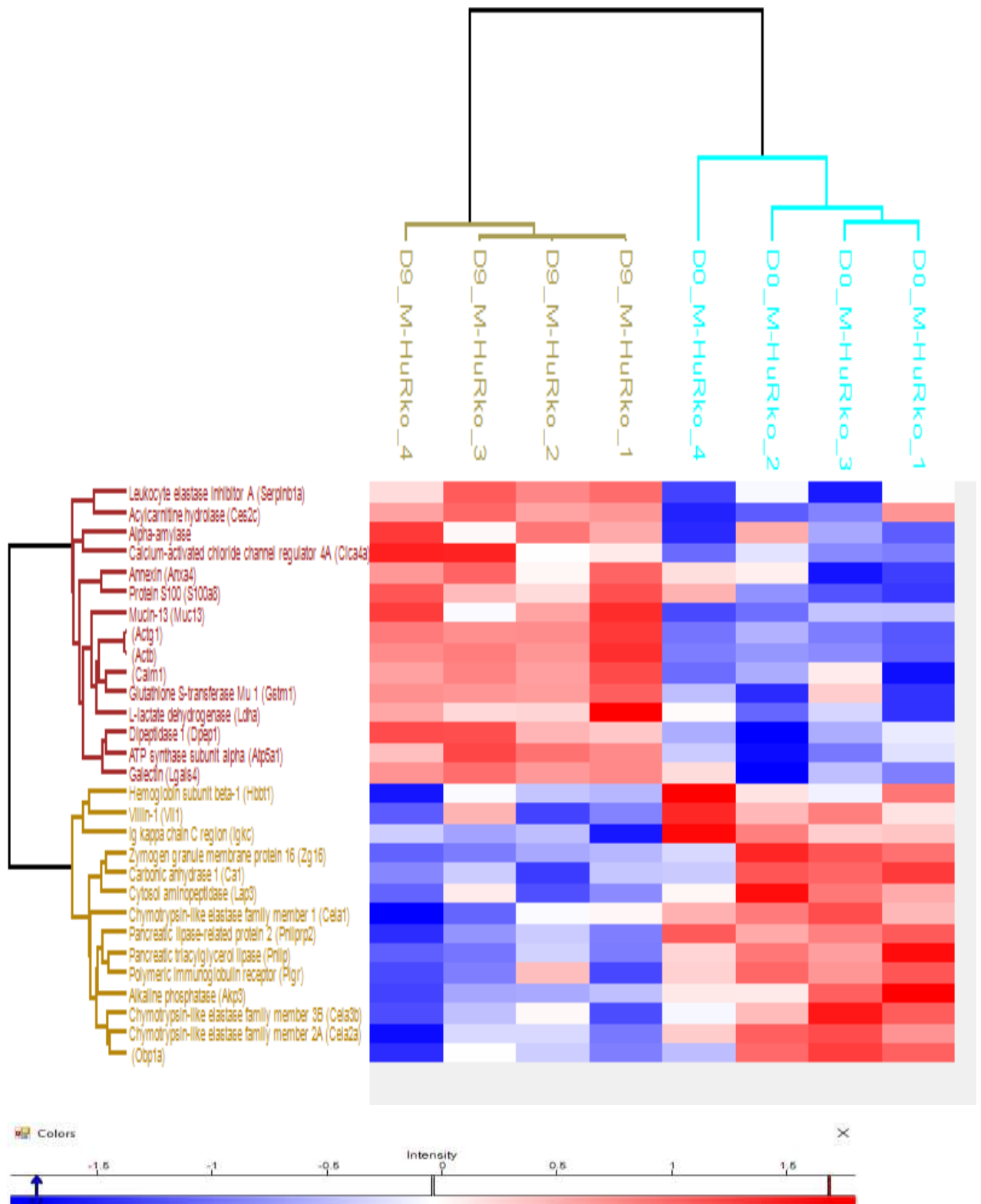




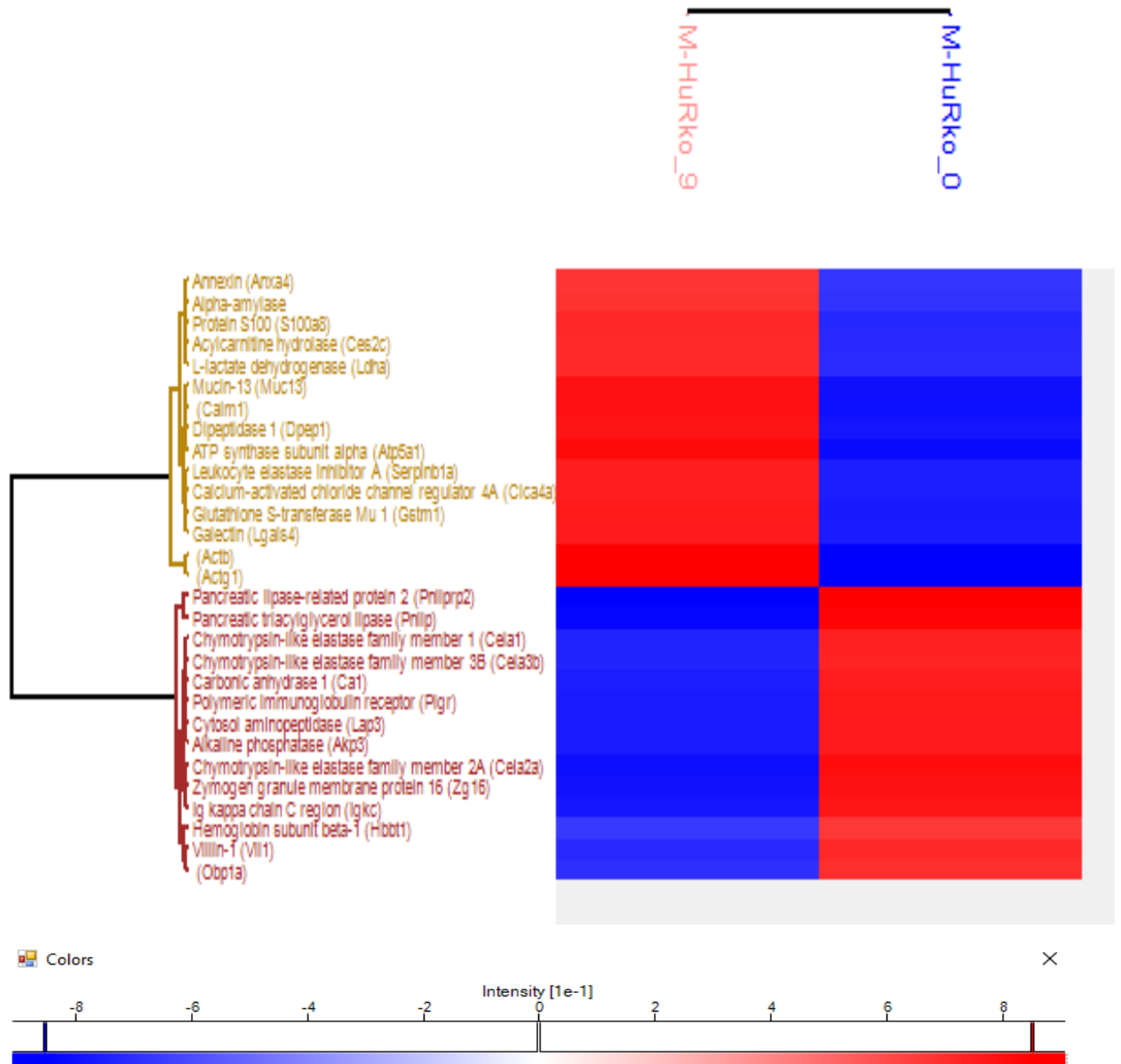
**Εικόνα 7.9.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.9, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρωνα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο/ομάδα, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).



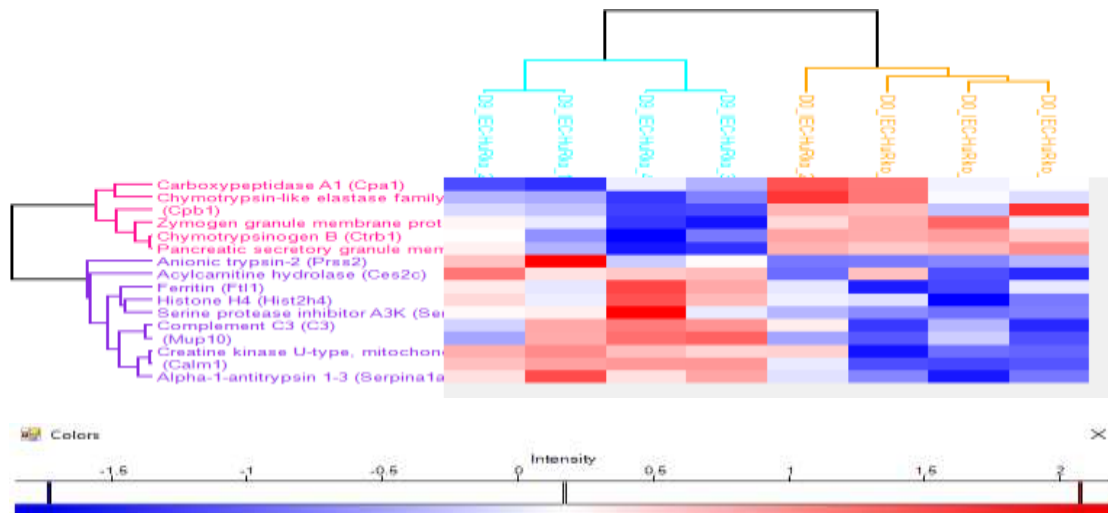
**Εικόνα 7.9.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.9, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, Control, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, Control day0 vs Control day9).



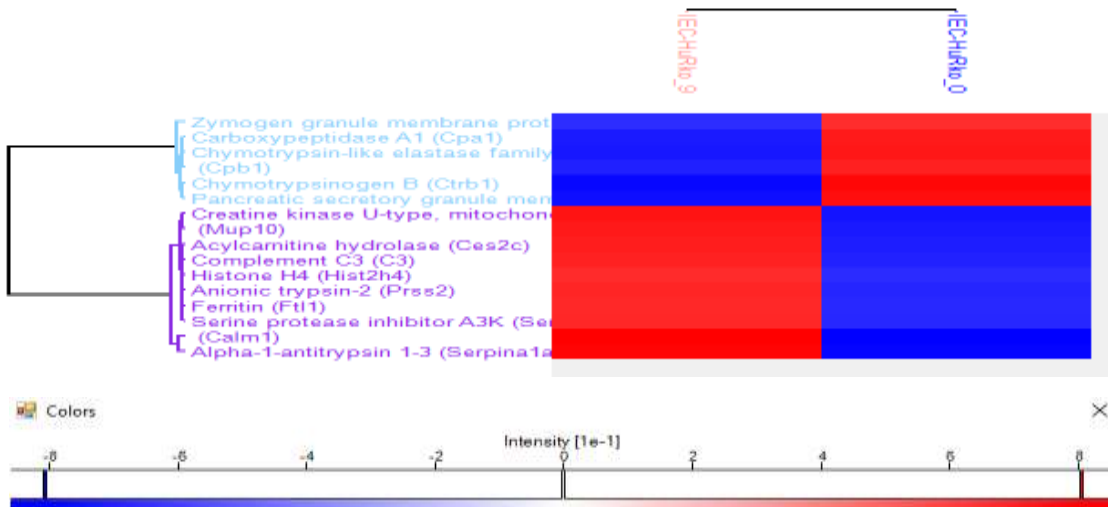
**Εικόνα 7.10.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.11, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρωνα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).



**Εικόνα 7.10.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.11, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, M-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, M-HuRko day0 vs M-HuRko day9).



**Εικόνα 7.11.1:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.13, μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων, 3<sup>ου</sup> πειράματος από κόπρανα ποντικών με τον ίδιο γονότυπο, IEC-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (ημέρα 0 vs ημέρα 9).



**Εικόνα 7.11.2:** Θερμικός Χάρτης (Heat Map), όπου απεικονίζεται η σχετική έκφραση για την κάθε στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη/γονίδιο του Σχήματος 7.13, όταν συγκρίνονται οι μέσοι όροι των εντάσεων των βιολογικών επαναλήψεων του ίδιου γονότυπου/ομάδας, IEC-HuRko, σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ημέρα 0 vs ημέρα 9 (3<sup>rd</sup> exp, IEC-HuRko day0 vs IEC-HuRko day9).

Τέλος, παρατηρώντας τους θερμικούς χάρτες μόνο των μέσων όρων (heat maps of average groups) και αντιστοιχίζοντας με τις τιμές έντασης από τις συστοιχίες μήτρας του Perseus, συγκεντρώθηκαν και καταγράφηκαν οι στατιστικά σημαντικότερες πρωτεΐνες καθώς και οι σχετικές εκφράσεις τους

στον κάθε γονότυπο/ομάδα (η αντίθετη έκφραση θα ισχύει για την έναντι ομάδα/γονότυπο).

**Πίνακας 7.2:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όπως παρέχονται από την ανάλυση Perseus και τις απεικονίσεις των θερμικών χαρτών, που αφορούν στους μέσους όρους των βιολογικών επαναλήψεων (heat maps of average groups), όπου καταγράφονται οι πρωτεΐνες/γονίδια με τη μεγαλύτερη ένταση, δηλαδή οι πιο υπερ-εκφρασμένες ↑ , καθώς και αυτές με τη χαμηλότερη ένταση, δηλαδή οι πιο υπο-εκφρασμένες ↓.

<b>Εικόνα/HeatMap</b>	<b>Πρωτεΐνη/γονίδιο</b>	<b>Έκφραση</b>
		<b>Tg+(vs Tg-)</b>
7.1.2	Aminopeptidase/Anpep	↑
7.1.2	Heat-shock protein family A(Hsp70) member	↓
7.4.2	2210407C18Rik	↑
7.4.2	Sushi domain-containing protein 2/Susd2	↓
		<b>M-HuRko(vs Control)</b>
7.2.2	Lithostathine-2 / Reg2	↓
7.2.2	Colipase / Clps	↑
7.5.2	Leukocyte elastase inhibitor / Serpina1b	↓
7.5.2	GM5938/OBP6	↑
		<b>IEC-HuRko(vs Control)</b>
7.3.2	Creatine kinase U-type mitochondrial / Ckmt1	↑
7.3.2	Obp1a	↓
7.6.2	Leucocyte elastase inhibitor A /Serpina1a	↓
7.6.2	Mup10 / Mup1	↑
		<b>Tg-_9 (vs Tg-_0)</b>
7.7.2	Epithelial cell adhesion molecule / Epcam	↓
7.7.2	Obp1a ; OBP5	↓
		<b>Tg+_9(vs Tg+_0)</b>
7.8.2	Carboxypeptidase A2 / Cpa2	↓
7.8.2	Creatine kinase U-type mitochondrial / Ckmt1	↓
7.8.2	Csf1	↑
7.8.2	Annexin A4 / Anxa4	↑
		<b>Control_9(vs Control_0)</b>
7.9.2	Chymotrypsin-like elastase family member 2A /	↓
7.9.2	Cytosol aminopeptidase / Lap3	↓
7.9.2	Mucin 13 / Muc13	↑
		<b>M-HuRko_9 (vs M-</b>
7.10.2	Pancreatic lipase-related protein 2 / Pnliprp2	↓
7.10.2	Pancreatic triacylglycerol lipase (Pnlip)	↓
7.10.2	Actb	↑
7.10.2	Actg1	↑
		<b>IEC-HuRko_9(vs IEC-</b>
7.11.2	Chymotrypsinogen B / Ctrb1	↓
7.11.2	Pancreatic secretory granule membrane major	↓
7.11.2	Calm1	↑
7.11.2	Alpha-1-antitrypsin 1-3 ; Alpha-1-antitrypsin 1-1 /	↑

### 7.1.3.3 Βιοπληροφορική ανάλυση με Panther και DAVID

Το Panther σχεδιάστηκε για να ταξινομεί τις πρωτεΐνες (και τα γονίδιά τους) και να διευκολύνει την ανάλυση υψηλής απόδοσης<sup>(127,128)</sup>. Οι πρωτεΐνες έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με:

- Οικογένεια και υποοικογένεια: Οι οικογένειες είναι ομάδες εξελικτικά συγγενών πρωτεϊνών. Οι υποοικογένειες είναι σχετικές πρωτεΐνες που έχουν επίσης την ίδια λειτουργία
- Μοριακή λειτουργία (Molecular Function – MF): η λειτουργία της πρωτεΐνης από μόνη της ή με άμεσα αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες σε βιοχημικό επίπεδο, π.χ. μια πρωτεϊνική κινάση
- Βιολογική διαδικασία (Biological Function – BF): η λειτουργία της πρωτεΐνης στο πλαίσιο ενός μεγαλύτερου δικτύου πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν για την επίτευξη μιας διαδικασίας στο επίπεδο του κυττάρου ή του οργανισμού, π.χ. μίτωσης.
- Οδός (Pathway): παρόμοια με τη βιολογική διαδικασία, αλλά μια οδός επίσης καθορίζει ρητά τις σχέσεις μεταξύ των αλληλεπιδρώντων μορίων.

Ο διαδικτυακός ισότοπος του Panther παρέχει εργαλεία για την ανάλυση μιας λίστας γονιδίων ή πρωτεϊνών. Έτσι είναι δυνατή η καταχώριση μιας λίστας γονιδίων / πρωτεϊνών με σκοπό τη λειτουργική ταξινόμηση με την Οντολογία των Γονιδίων, την κατηγορία πρωτεϊνών PANTHER, την οδό PANTHER και το Reactome Pathway. Τα αποτελέσματα μπορούν να εμφανιστούν είτε ως σελίδα λίστας γονιδίων είτε ως διάγραμμα πίτας<sup>(124–126)</sup>.

Το εργαλείο DAVID κυκλοφόρησε το 2003, ως ένα από τα πρωτοπόρα έργα στον τομέα, του λειτουργικού σχολιασμού υψηλής απόδοσης, της βιοπληροφορικής<sup>(129,130)</sup>. Έκτοτε, αναπτύσσονται συνεχώς, σειρές καινοτόμων αλγορίθμων βιοπληροφορικής και αναφέρονται σε επιστημονικά άρθρα (peer-reviewed papers). Η μέθοδος DAVID έχει αποκτήσει ένα μεγαλύτερο αριθμό παραπομπών από την κοινότητα της γονιδιωματικής και έχει καταταχθεί ως το πιο συχνά αναφερόμενο εργαλείο εμπλουτισμού. Λόγω τέτοιων επιτευγμάτων, πρόσφατα συγκεντρώθηκαν μέθοδοι DAVID από το αναγνωρισμένο περιοδικό Nature Protocols, καθώς και από το γνωστό εργαστηριακό βιβλίο Current Protocols, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το αρχείο καταγραφής του διακομιστή web DAVID, ο όγκος χρηστών του εξυπηρετητή DAVID είναι σταθερά σε υψηλότερο επίπεδο κάθε μέρα (δηλαδή ~ 60000 επισκέψεις από ~ 300 μοναδικούς ερευνητές την ημέρα, συνολικά εκατοντάδες εκατομμύρια επισκέψεων από δεκάδες χιλιάδες επισκέψεις κατά τα τελευταία 5 χρόνια) .

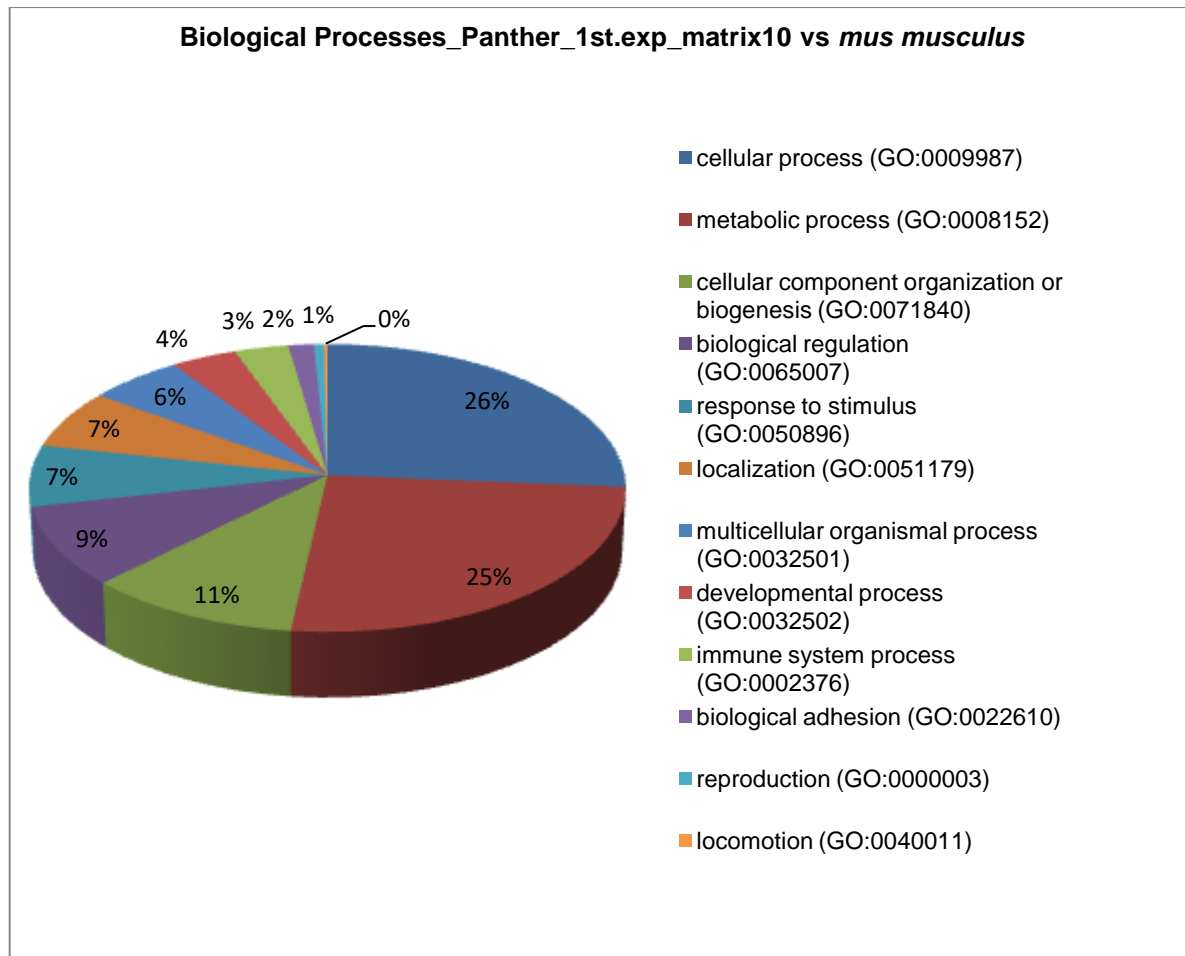
Το υψηλότερο επίπεδο ολοκλήρωσης και η εκτεταμένη κάλυψη δεδομένων της DAVID Knowledgebase (η βάση δεδομένων των αναλυτικών εργαλείων του DAVID), σπάνια βρίσκονται σε άλλα παρόμοια έργα (τα οποία συνήθως χρησιμοποιούν μόνο έναν ή λίγους δημόσιους πόρους ως βάση δεδομένων). Στο DAVID Knowledgebase, πάνω από 20 τύποι αναγνωριστικών γονιδίων και περισσότερες από 40 λειτουργικές κατηγορίες σχολιασμού από τουλάχιστον δώδεκα ετερογενείς δημόσιες βάσεις δεδομένων, ενσωματώνονται ολοκληρωμένα σε μια μοναδική, ενιαίας- σύνδεσης μέθοδο, που αναπτύχθηκε από την ομάδα DAVID. Χωρίς αμφιβολίες, η DAVID Knowledgebase, ως αποθήκη «one-stop shopping», μεγιστοποιεί το αναλυτικό δυναμικό για όλους τους αλγόριθμους λειτουργικού σχολιασμού.

Αρχικά, με το Panther αναλύθηκε η 10<sup>η</sup> συστοιχία μήτρας του 1<sup>ου</sup> πειράματος (1<sup>st</sup> exp matrix10) έναντι βάσης δεδομένων υποβάθρου (background) *mus musculus*. Ενώ, με το DAVID πραγματοποιήθηκε ενισχυμένη / εμπλουτισμένη ανάλυση (enriched analysis), της συνδυασμένης λίστας από τις συστοιχίες μήτρας 26, 27 και 28 του 1<sup>ου</sup> πειράματος (1<sup>st</sup> exp matrix26,27,28) έναντι της 1<sup>st</sup> exp matrix10 ως υποβάθρου (background). Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων ταξινομήθηκαν λειτουργικά με βάση την Βιολογική Διαδικασία (Biological Process/Function) και παραθέτονται ευθύς αμέσως.

**Πίνακας 7.3:** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων/πρωτεϊνών που ελήφθησαν από την ανάλυση της 10<sup>ης</sup> συστοιχίας μήτρας του 1<sup>ου</sup> πειράματος (1<sup>st</sup> exp matrix10) έναντι βάσης δεδομένων υποβάθρου *mus musculus*, με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής Panther

Biological Processes	Counts (genes)	percentege
cellular process (GO:0009987)	123	26.30%
metabolic process (GO:0008152)	119	25.50%
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	50	10.70%
biological regulation (GO:0065007)	42	9.00%
response to stimulus (GO:0050896)	32	6.90%
localization (GO:0051179)	31	6.60%
multicellular organismal process (GO:0032501)	26	5.60%
developmental process (GO:0032502)	18	3.90%
immune system process (GO:0002376)	15	3.20%
biological adhesion (GO:0022610)	7	1.50%
reproduction (GO:0000003)	3	0.60%
locomotion (GO:0040011)	1	0.20%





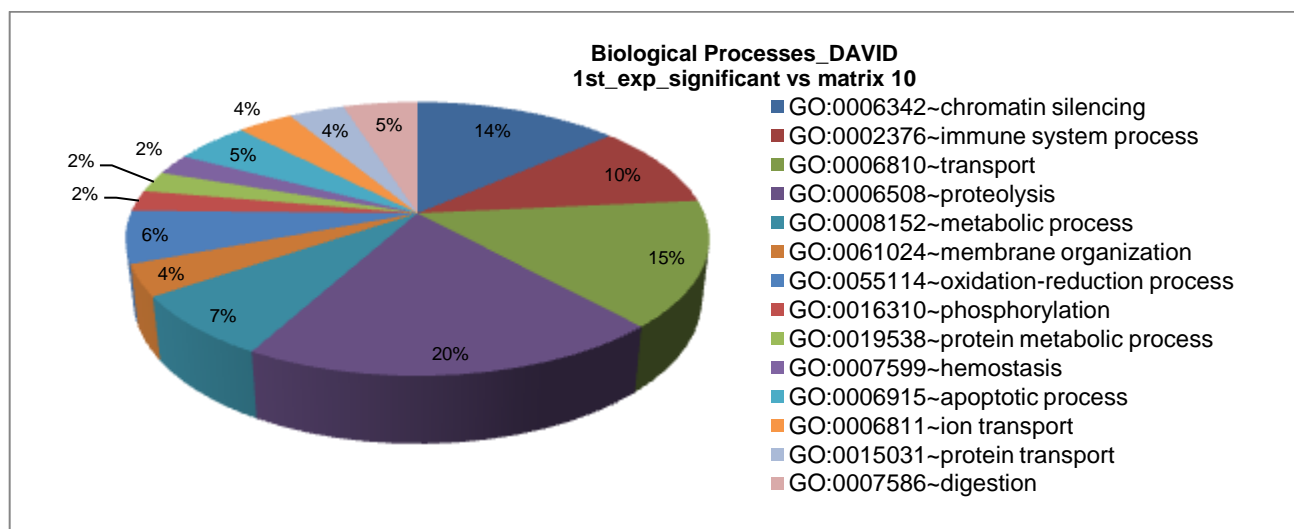
**Γράφημα 7.1:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.3

**Πίνακας 7.4:** Καταγραφή των γονιδίων / πρωτεϊνών που ανήκουν στην Βιολογική Διαδικασία “immune system process” του Πίνακα 7.3 , όπως εξήχθη από τη βιοπληροφορική εφαρμογή Panther

Mapped IDs	Gene Name / Gene Symbol (Ortholog)	PANTHER : Family / Sub-family	PANTHER : Protein Class
Pip	Prolactin-inducible protein homolog;Pip;ortholog	PROLACTIN-INDUCIBLE PROTEIN (PTHR15096:SF5)	
Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein;Hspa8;ortholog	HEAT SHOCK COGNATE 71 KDA PROTEIN (PTHR19375:SF239)	
S100a8	Protein S100-A8;S100a8;ortholog	PROTEIN S100-A8 (PTHR11639:SF5)	calmodulin(PC00061);signaling molecule(PC00207)
Try4	MCG15085;Try4;ortholog	TRYPSIN-2 (PTHR24264:SF15)	serine protease(PC00203)
Cdhr5	Cadherin-related family member 5;Cdhr5;ortholog	CADHERIN-RELATED FAMILY MEMBER 5 (PTHR24028:SF243)	
Muc3	Mucin intestinal;Muc3;ortholog	MUCIN-12 (PTHR24041:SF25)	
H2afz	Histone H2A.Z;H2afz;ortholog	HISTONE H2A.Z (PTHR23430:SF47)	
Smpdl3a	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a;Smpdl3a;ortholog	ACID SPHINGOMYELINASE-LIKE PHOSPHODIESTERASE 3A (PTHR10340:SF24)	
Hist3h2a	Histone H2A type 3;Hist3h2a;ortholog	HISTONE H2A TYPE 3 (PTHR23430:SF220)	histone(PC00118)
H2afx	Histone H2AX;H2afx;ortholog	HISTONE H2AX (PTHR23430:SF199)	histone(PC00118)
Gm1123	CAR-like soluble protein;Gm1123;ortholog	CAR-LIKE SOLUBLE PROTEIN (PTHR44468:SF4)	
H2-Aa	H-2 class II histocompatibility antigen, A-K alpha chain;H2-Aa;ortholog	HLA CLASS II HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, DQ ALPHA 1 CHAIN (PTHR19944:SF59)	major histocompatibility complex antigen(PC00149)
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;Gapdh;ortholog	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (PTHR10836:SF86)	dehydrogenase(PC00092)
Eps8l3	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein 3;Eps8l3;ortholog	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR KINASE SUBSTRATE 8-LIKE PROTEIN 3 (PTHR12287:SF22)	transmembrane receptor regulatory/adaptor protein(PC00226)
Serpina1e	Alpha-1-antitrypsin 1-5;Serpina1e;ortholog	ALPHA-1-ANTITRYPSIN (PTHR11461:SF165)	serine protease inhibitor(PC00204)

**Πίνακας 7.5:** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων / πρωτεϊνών που ελήφθησαν από την ενισχυμένη / εμπλουτισμένη ανάλυση (enriched analysis), της συνδυασμένης λίστας από τις συστοιχίες μήτρας 26, 27 και 28 του 1<sup>ου</sup> πειράματος (1<sup>st</sup> exp matrix26,27,28 ; Perseus) έναντι της 1<sup>st</sup> exp matrix10 ως υποβάθρου (background), με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής DAVID.

Gene Ontology Term	%	PValue	Genes
GO:0006342--chromatin silencing	13.92405063	1.62E-08	HIST2H2AB, HIST1H2AA, HIST1H2AF, HIST2H2AC, H2AFZ, HIST1H2AH, HIST1H2AK, H2AFX, HIST3H2A, H2AFJ, HIST2H2AA1
GO:0002376--immune system process	10.12658228	1.72E-08	CHIA1, FGA, C3, FGB, PGLYRP1, LTF, H2-AA, HP
GO:0006810--transport	15.18987342	1.84E-06	UQCRC2, TTR, ATP1B1, CLCA4A, CUBN, SLC15A1, HPX, OBP1A, ATP5B, ZG16, SLC25A3, LTF
GO:0006508--proteolysis	20.25316456	3.42E-06	UQCRC2, PEPD, CLCA4A, CNDP2, CTRB1, TRY5, ANPEP, HP, TRY4, KLK1, DNPEP, LAP3, ACE2, LTF, CPA1, TMPRSS15
GO:0008152--metabolic process	7.594936709	2.78E-04	PKM, CHIA1, AMY1, CNDP2, ENPP3, CHIL3
GO:0061024--membrane organization	3.797468354	0.002851114	ACTG1, ACTB, CALM1
GO:0055114--oxidation-reduction process	6.329113924	0.04044077	UQCRC2, CYP2C55, LDHA, MAOA, IDH1
GO:0016310--phosphorylation	2.53164557	0.041830604	PKM, CKMT1
GO:0019538--protein metabolic process	2.53164557	0.05538694	LAP3, CDH1
GO:0007599--hemostasis	2.53164557	0.05538694	FGA, FGB
GO:0006915--apoptotic process	5.063291139	0.063555628	CHIA1, MUC2, VIL1, PGLYRP1
GO:0006811--ion transport	3.797468354	0.07047558	ATP1B1, ATP5B, LTF
GO:0015031--protein transport	3.797468354	0.087019748	CUBN, SLC15A1, ZG16
GO:0007586--digestion	5.063291139	0.094619037	CLPS, CTRB1, TRY5, TRY4



**Γράφημα 7.2:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.5

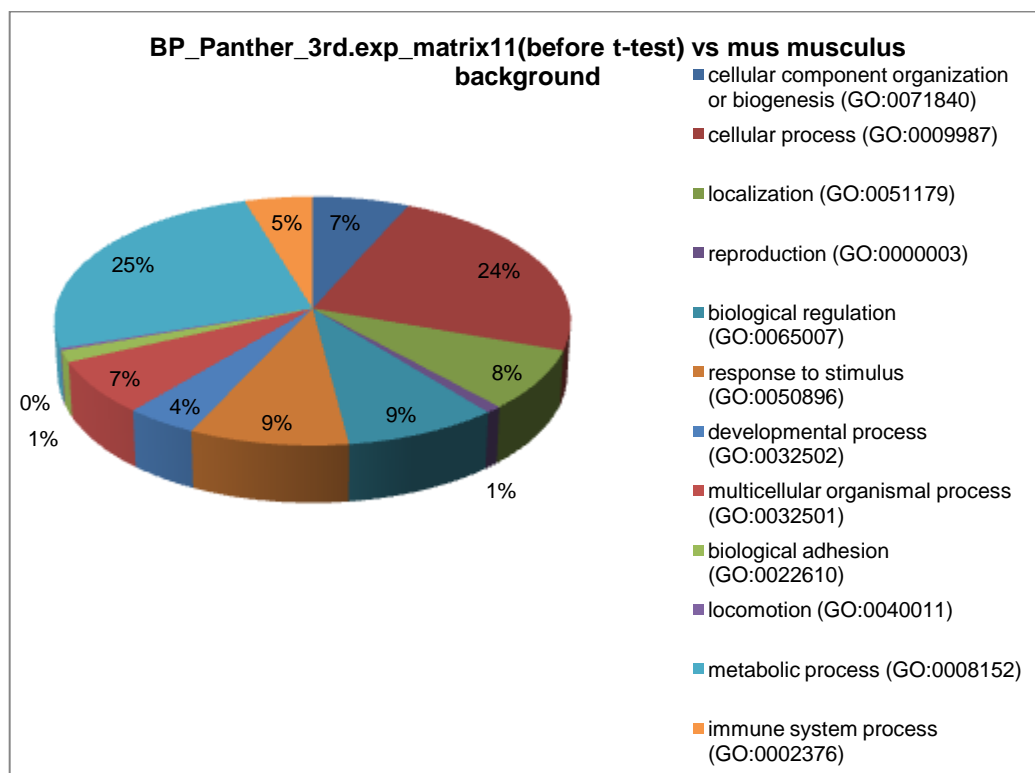
**Πίνακας 7.6:** Καταγραφή των γονιδίων/πρωτεϊνών που ανήκουν στην Βιολογική Διαδικασία "immune system process" του Πίνακα 7.5, όπως εξάχθηκε από τη βιοπληροφορική εφαρμογή DAVID

ID	Gene Name	Species
Chia1	chitinase, acidic 1(Chia1)	Mus
C3	complement component 3(C3)	Mus
Fga	fibrinogen alpha chain(Fga)	Mus
Fgb	fibrinogen beta chain(Fgb)	Mus
Hp	haptoglobin(Hp)	Mus
H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha(H2-	Mus
Ltf	lactotransferrin(Ltf)	Mus
Pglyrp1	peptidoglycan recognition protein 1(Pglyrp1)	Mus

Στη συνέχεια, με το Panther αναλύθηκε η 11<sup>η</sup> συστοιχία μήτρας του 3<sup>ου</sup> πειράματος (3<sup>rd</sup> exp matrix11) έναντι βάσης δεδομένων υποβάθρου (background) *mus musculus*. Ενώ, με το DAVID πραγματοποιήθηκε ενισχυμένη / εμπλουτισμένη ανάλυση (enriched analysis), της συνδυασμένης λίστας από τις συστοιχίες μήτρας 68, 70 και 72 του 3<sup>ου</sup> πειράματος (3<sup>rd</sup> exp matrix68,70,72) έναντι της 3<sup>rd</sup> exp matrix11 ως υποβάθρου (background). Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων ταξινομήθηκαν λειτουργικά με βάση την Βιολογική Διαδικασία (Biological Process/Function) και παραθέτονται ευθύς αμέσως.

**Πίνακας 7.7:** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων/πρωτεϊνών, που λήφθησαν από την ανάλυση της 11<sup>ης</sup> συστοιχίας μήτρας του 3<sup>ου</sup> πειράματος (3<sup>rd</sup> exp matrix11) έναντι βάσης δεδομένων υποβάθρου *mus musculus*, με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής Panther

Biological Processes	Counts	percenteg
cellular component organization or biogenesis	23	6.70%
cellular process (GO:0009987)	81	23.70%
localization (GO:0051179)	27	7.90%
reproduction (GO:0000003)	3	0.90%
biological regulation (GO:0065007)	30	8.80%
response to stimulus (GO:0050896)	31	9.10%
developmental process (GO:0032502)	14	4.10%
multicellular organismal process (GO:0032501)	24	7.00%
biological adhesion (GO:0022610)	5	1.50%
locomotion (GO:0040011)	1	0.30%
metabolic process (GO:0008152)	87	25.40%
immune system process (GO:0002376)	16	4.70%



**Γράφημα 7.3:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.7

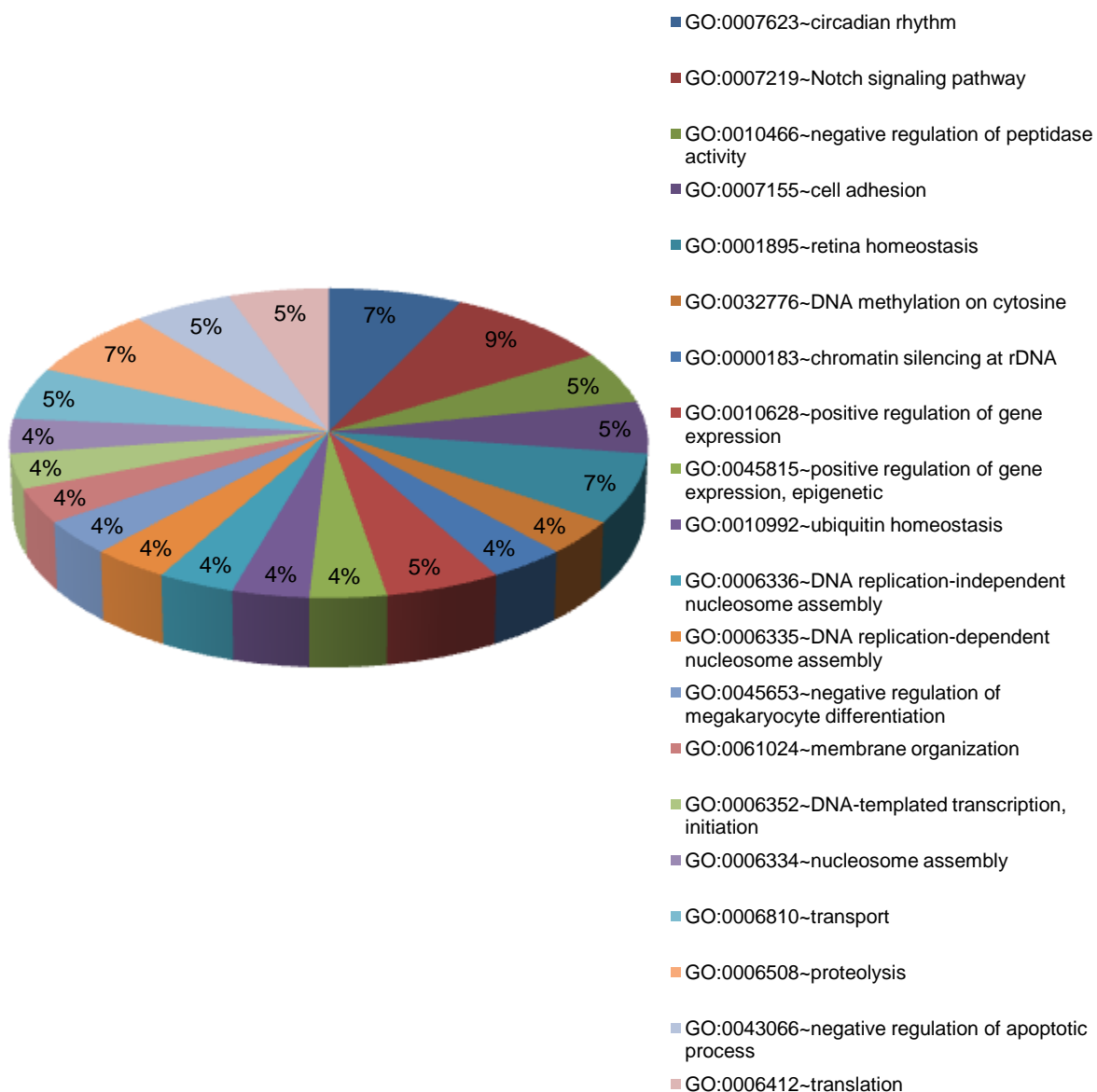
**Πίνακας 7.8 :** Καταγραφή των γονιδίων / πρωτεϊνών που ανήκουν στην Βιολογική Διαδικασία “immune system process” του Πίνακα 7.7, όπως εξήχθη από τη βιοπληροφορική εφαρμογή Panther

Gene ID	Mapped IDs	Gene Name / Gene Symbol (Ortholog)	PANTHER : Family / Sub-family	PANTHER : Protein Class
MOUSE MGI=MGI=94919 UniProtKB=P28843	Dpp4	Dipeptidyl peptidase 4;Dpp4;ortholog	DIPEPTIDYL PEPTIDASE 4 (PTHR11731:SF128)	enzyme modulator(PC00095);serine protease(PC00203)
MOUSE MGI=MGI=99580 UniProtKB=P50706	Defa8	Alpha-defensin 8 (Fragment);Defa8;ortholog	ALPHA-DEFENSIN 1-RELATED (PTHR11876:SF2)	
MOUSE MGI=MGI=96495 UniProtKB=P01837	Igkc	Ig kappa chain C region;unassigned;ortholog	IMMUNOGLOBULIN KAPPA CONSTANT (PTHR23266:SF79)	
MOUSE MGI=MGI=3648544 UniProtKB=P01754	Igh-VJ558	Ig heavy chain V region 1-62-3;Ighv1-62-3;ortholog	IMMUNOGLOBULIN HEAVY VARIABLE 1-58 (PTHR23266:SF220)	
MOUSE MGI=MGI=97798 UniProtKB=Q05769	COX2	Prostaglandin G/H synthase 2;Ptgs2;ortholog	PROSTAGLANDIN G/H SYNTHASE 2 (PTHR11903:SF8)	oxygenase(PC00177)
MOUSE MGI=MGI=4439824 UniProtKB=P01749	Igh-VJ558	Ig heavy chain V region 3;Ighv1-61;ortholog	IMMUNOGLOBULIN HEAVY VARIABLE 1-58 (PTHR23266:SF220)	
MOUSE MGI=MGI=96486 UniProtKB=P01758	Igh-VJ558	Ig heavy chain V region 108A;Igh-VJ558;ortholog	IG HEAVY CHAIN V REGION 108A-RELATED (PTHR23266:SF196)	
MOUSE MGI=MGI=94882 UniProtKB=P28309	Defa2	Alpha-defensin 2;Defa2;ortholog	ALPHA-DEFENSIN 1-RELATED (PTHR11876:SF2)	
MOUSE MGI=MGI=105983 UniProtKB=O08692	Ngp	Neutrophilic granule protein;Ngp;ortholog	NEUTROPHILIC GRANULE PROTEIN (PTHR10206:SF0)	antibacterial response protein(PC00051);protease inhibitor(PC00191)
MOUSE MGI=MGI=99585 UniProtKB=P50714	Defa16	Alpha-defensin 16;Defa16;ortholog	ALPHA-DEFENSIN 1-RELATED (PTHR11876:SF2)	
MOUSE MGI=MGI=3704123 UniProtKB=A0A0A6YY38	Ighv1-42	Immunoglobulin heavy variable V1-42 (Fragment);Ighv1-42;ortholog	IG HEAVY CHAIN V REGION 108A-RELATED (PTHR23266:SF196)	
MOUSE MGI=MGI=4439889 UniProtKB=A0A0A6YWK5	Ighv1-31	Immunoglobulin heavy variable 1-31 (Fragment);Ighv1-31;ortholog	IG HEAVY CHAIN V REGION 108A-RELATED (PTHR23266:SF196)	
MOUSE MGI=MGI=94883 UniProtKB=P28310	Defa3	Alpha-defensin 3;Defa3;ortholog	ALPHA-DEFENSIN 1-RELATED (PTHR11876:SF2)	
MOUSE MGI=MGI=4439641 UniProtKB=A0A075B5V0	Ighv1-26	Immunoglobulin heavy variable 1-26 (Fragment);Ighv1-26;ortholog	IG HEAVY CHAIN V REGION 108A-RELATED (PTHR23266:SF196)	
MOUSE MGI=MGI=99581 UniProtKB=P50705	Defa7	Alpha-defensin 7;Defa7;ortholog	ALPHA-DEFENSIN 1-RELATED (PTHR11876:SF2)	
MOUSE MGI=MGI=99588 UniProtKB=P50711	Defa13	Alpha-defensin 13;Defa13;ortholog	ALPHA-DEFENSIN 1-RELATED (PTHR11876:SF2)	

**Πίνακας 7.9 :** Ταξινόμηση σε Βιολογικές Διαδικασίες των γονιδίων / πρωτεϊνών, που ελήφθησαν από την ενισχυμένη / εμπλουτισμένη ανάλυση (enriched analysis), της συνδυασμένης λίστας από τις συστοιχίες μήτρας 68, 70 και 72 του 3<sup>ου</sup> πειράματος (3<sup>rd</sup> exp matrix68,70,72) έναντι της 3<sup>rd</sup> exp matrix11 ως υποβάθρου (background), με τη χρήση της βιοπληροφορικής εφαρμογής DAVID.

Gene Ontology Term	%	PValue	Genes
GO:0007623~circadian rhythm	10.53	1.02E-06	UBC, UBB, RPS27A, UBA52
GO:0007219~Notch signaling pathway	13.16	2.57E-05	UBC, UBB, ANXA4, RPS27A, UBA52
GO:0010466~negative regulation of peptidase activity	7.895	4.36E-04	SERPINA1B, SERPINC1, SERPINB1A
GO:0007155~cell adhesion	7.895	0.002818552	CDHR5, CUZD1, DPP4
GO:0001895~retina homeostasis	10.53	0.005828152	ACTG1, ACTB, ALB, PIP
GO:0032776~DNA methylation on cytosine	5.263	0.006365487	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0000183~chromatin silencing at rDNA	5.263	0.009533508	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0010628~positive regulation of gene expression	7.895	0.00972355	MUP1, PIP, HSPA8
GO:0045815~positive regulation of gene expression, epigenetic	5.263	0.012691753	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0010992~ubiquitin homeostasis	5.263	0.012691753	UBC, UBB
GO:0006336~DNA replication-independent nucleosome assembly	5.263	0.018979033	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0006335~DNA replication-dependent nucleosome assembly	5.263	0.018979033	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0045653~negative regulation of megakaryocyte differentiation	5.263	0.018979033	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0061024~membrane organization	5.263	0.018979033	ACTG1, ACTB
GO:0006352~DNA-templated transcription, initiation	5.263	0.018979033	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0006334~nucleosome assembly	5.263	0.018979033	HIST1H4A, HIST2H4
GO:0006810~transport	7.895	0.023036929	ALB, ATP5B, ZG16
GO:0006508~proteolysis	10.53	0.036473718	PIP, DPP4, DPEP1, DNPEP
GO:0043066~negative regulation of apoptotic process	7.895	0.046105818	ALB, CKMT1, DPEP1
GO:0006412~translation	7.895	0.048430729	KXD1, RPS27A, UBA52

### BP\_3rd.exp\_significant vs matrix11



**Γράφημα 7.4:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά τα δεδομένα του Πίνακα 7.9



## 7.2 Μετα-πρωτεωμική ανάλυση

Για να υλοποιήσουμε το σκοπό της ταξονομικής ανάλυσης, τα πρωτεϊνικά δείγματα που δημιουργήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως από τις ενότητες 7.1 έως και 7.1.3, υποβλήθηκαν σε ανάλυση μέσω του άξονα Proteome Discoverer – Unipept LCA (πρωτόκολλο ενότητα 6.4.5 και 6.4.6).

Το **Unipept** αποτελεί μια διαδικτυακή εφαρμογή, η οποία προσφέρει έναν, φιλικό στο χρήστη, τρόπο να εξερευνεί την βιοποικιλότητα πολύπλοκων μετα-πρωτεωμικών δειγμάτων, παρέχοντας διαδραστική οπτικοποίησή τους<sup>(111–113)</sup>.

Το Unipept (<http://unipept.ugent.be>) ενσωματώνει έναν γρήγορο δείκτη τρυπτικών πεπτιδίων που κατασκευάστηκε από τις βιβλιοθήκες UniProt Knowledgebase (UniProtKB)(108) με πληροφορίες από τη βάση δεδομένων της NCBI Taxonomy(110) για να επιτρέψει την ανάλυση της βιοποικιλότητας των δειγμάτων μετα-πρωτεωμικής. Οι χρήστες μπορούν να υποβάλουν τα τρυπτικά πεπτίδια που λαμβάνονται από πειράματα “shotgun” MS / MS, στα οποία η εφαρμογή αποκρίνεται με μια λίστα όλων των αρχείων UniProtKB που περιέχουν αυτό το πεπτίδιο. Η βάση δεδομένων NCBI Taxonomy χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της πλήρους ταξονομικής καταγωγής κάθε καταγραφής του UniProtKB, στην ομάδα των αποτελεσμάτων. Ακολουθώντας, αυτές οι καταγωγές/γενεές συνδυάζονται για να υπολογίσουν την κοινή καταγωγή του υποβληθέντος πεπτιδίου. Από αυτή την κοινή καταγωγή, ο πιο συγκεκριμένος ταξονομικός κόμβος (taxonomic node) προσδιορίζεται ως ο ‘χαμηλότερος κοινός πρόγονος’ (Lowest Common Ancestor-LCA) χρησιμοποιώντας έναν ισχυρό αλγόριθμο σάρωσης LCA. Οι προκύπτουσες πληροφορίες απεικονίζονται χρησιμοποιώντας μια διαδραστική απεικόνιση JavaScript που συνδυάζει όλες τις ταξονομικές γραμμές, συνοδευόμενες από έναν κατανοητό πίνακα που περιέχει όλες τις αντιστοιχισμένες εγγραφές του UniProtKB.

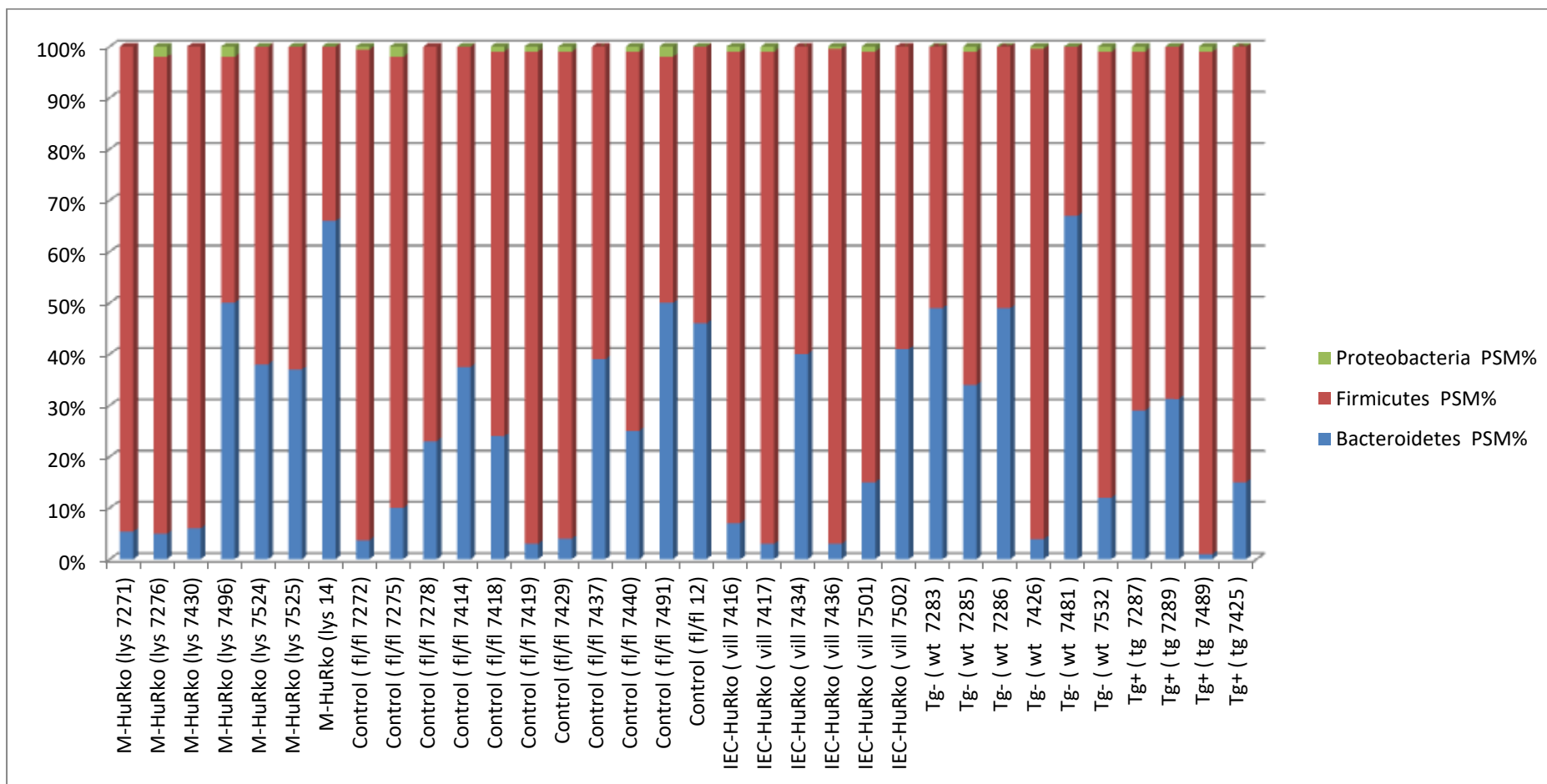
Οι χρήστες μπορούν επίσης να υποβάλουν μια λίστα με τρυπτικά πεπτίδια. Στην περίπτωση αυτή, η LCA υπολογίζεται για κάθε υποβληθέν πεπτίδιο όπως περιγράφεται παραπάνω. Αυτά τα LCAs στη συνέχεια συνοδεύονται σε πίνακα συχνότητας και εμφανίζονται στη σελίδα αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ένα διαδραστικό διάγραμμα (interactive treemap) (Σχήμα). Αυτό το διάγραμμα εμφανίζει ιεραρχικά δεδομένα σε μια γραφική παράσταση (ιστόγραμμα) πολλαπλών στρωμάτων. Το διάγραμμα ‘treemap’ διαθέτει και άλλες μορφές όπως ‘sunburst’ και ‘treeview’ (σχήμα). Όντας διαδραστικό δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να διαχειριστεί τις πληροφορίες, που του παρέχει, επιλέγοντας μεμονωμένους κόμβους. Αυτό επιτρέπει στους χρήστες να εστιάζουν σε μια περιοχή ενδιαφέροντος.

Συγκεκριμένα, εστίασαμε στα βακτηριακά φύλα *Bacteroidetes*, *Firmicutes* και *Proteobacteria*, και σε αντιστοιχία με τα PSMs (από Proteome Discoverer), των ταξινομηθέντων πεπτιδίων στα φύλα αυτά, δημιουργήθηκαν διαγράμματα

που αντιπροσωπεύουν την παρουσία ( ποσοστό επί τοις %) του κάθε βακτηριακού φύλου στο κάθε δείγμα.

**Πίνακας 7.10:** Ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria* (πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την ημέρα μηδέν (0)

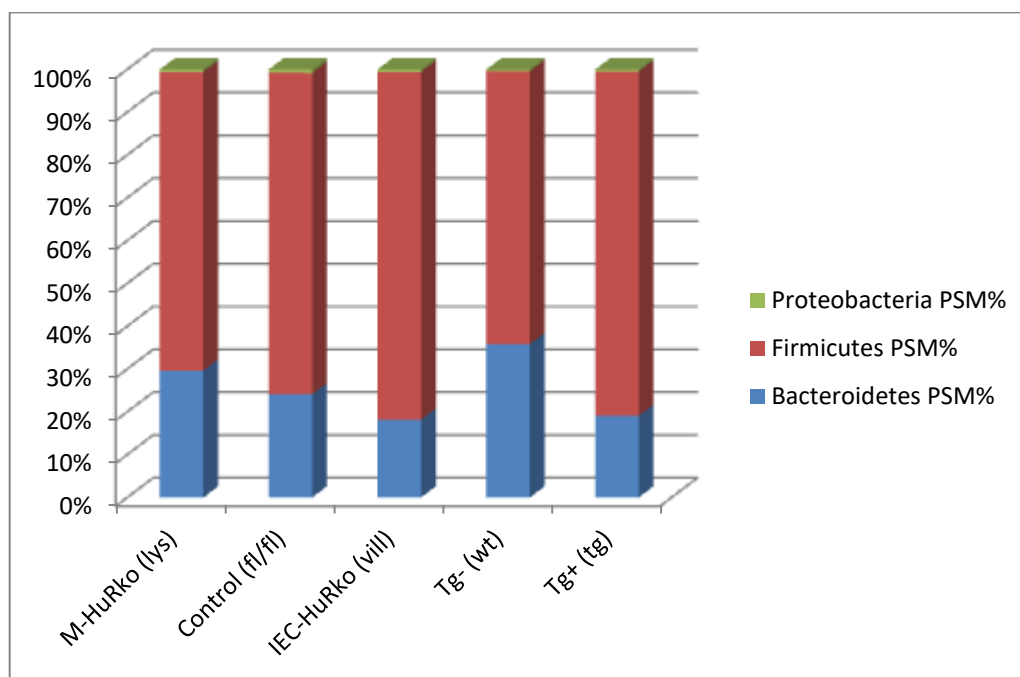
<b>Γονότυποι /</b>	<b><i>Bacteroidetes</i></b>	<b><i>Firmicutes</i></b>	<b><i>Proteobacteria</i></b>
M-HuRko (lys 7271)	5.4	94.6	0
M-HuRko (lys 7276)	5	93	2
M-HuRko (lys 7430)	6	94	0
M-HuRko (lys 7496)	50	48	2
M-HuRko (lys 7524)	38	62	0
M-HuRko (lys 7525)	37	63	0
M-HuRko (lys 14)	66	34	0
Control ( fl/fl 7272)	3.7	95.7	0.6
Control ( fl/fl 7275)	10	88	2
Control ( fl/fl 7278)	23	77	0
Control ( fl/fl 7414)	37.5	62.5	0
Control ( fl/fl 7418)	24	75	1
Control ( fl/fl 7419)	3	96	1
Control (fl/fl 7429)	4	95	1
Control ( fl/fl 7437)	39	61	0
Control ( fl/fl 7440)	25	74	1
Control ( fl/fl 7491)	50	48	2
Control ( fl/fl 12)	46	54	0
IEC-HuRko	7	92	1
IEC-HuRko	3	96	1
IEC-HuRko	40	60	0
IEC-HuRko	3	96.6	0.4
IEC-HuRko	15	84	1
IEC-HuRko	41	59	0
Tg- ( wt 7283 )	49	51	0
Tg- ( wt 7285 )	34	65	1
Tg- ( wt 7286 )	49	51	0
Tg- ( wt 7426)	3.9	95.7	0.4
Tg- ( wt 7481 )	67	33	0
Tg- ( wt 7532 )	12	87	1
Tg+ ( tg 7287)	29	70	1
Tg+ ( tg 7289 )	31.25	68.75	0
Tg+ ( tg 7489)	1	98	1
Tg+ ( tg 7425 )	15	85	0



**Γράφημα 7.5:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται τα ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα), *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την ημέρα μηδέν (0)

**Πίνακας 7.11 :** Μέσος όρος και τυπικές αποκλίσεις των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την ημέρα μηδέν (0)

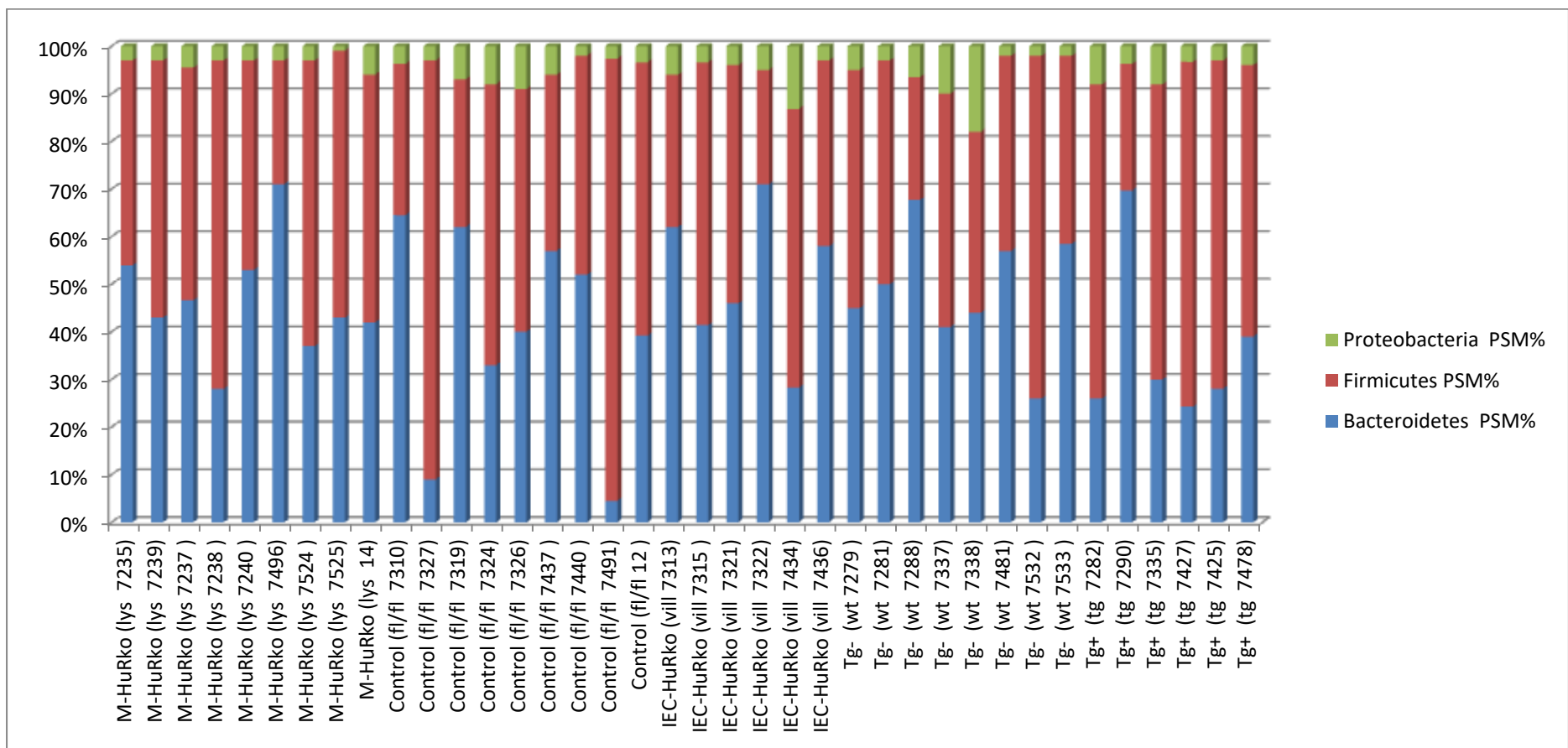
Γονότυποι / Ομάδες	<i>Bacteroidetes</i> PSM%		<i>Firmicutes</i> PSM%		<i>Proteobacteria</i> PSM%	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD
M-HuRko (lys)	29.6	24.5	69.8	24.5	0.6	10.0
Control (fl/fl)	24.1	17.4	75.1	17.2	0.8	0.8
IEC-HuRko (vill)	18.2	17.8	81.3	17.5	0.6	0.5
Tg- (wt)	35.8	24.1	63.8	23.8	0.4	0.5
Tg+ (tg)	19.1	14.0	80.4	13.8	0.5	0.6



**Γράφημα 7.6:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται οι μέσοι όροι των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 2ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την ημέρα μηδέν (0)

**Πίνακας 7.12:** Ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την 10η και 9η ημέρα, αντίστοιχα

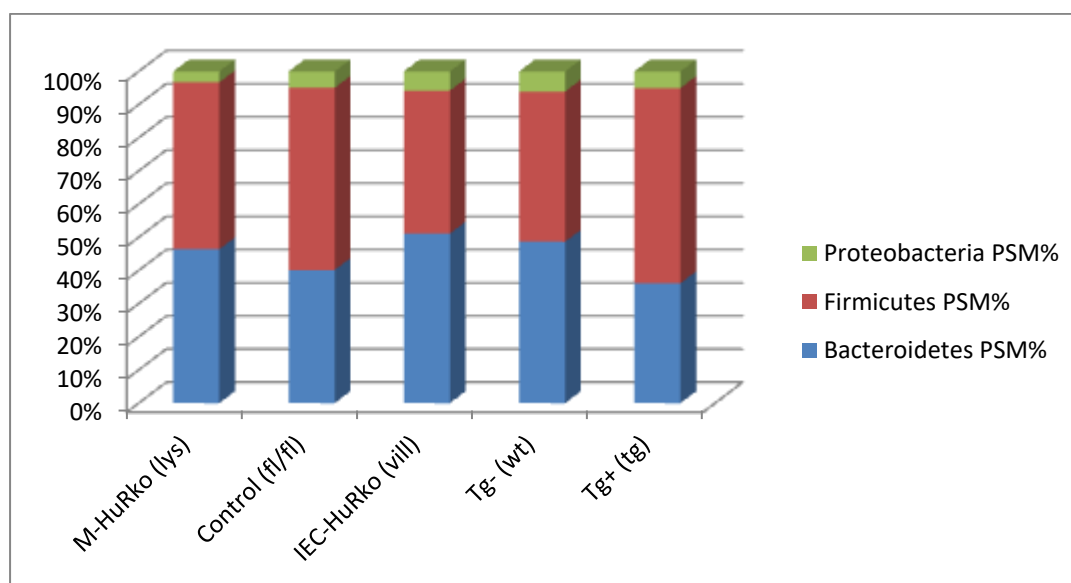
<b>Γονότυποι /</b>	<b><i>Bacteroidetes</i></b>	<b><i>Firmicutes</i></b>	<b><i>Proteobacteria</i></b>
M-HuRko (lys 7235)	54	43	3
M-HuRko (lys 7239)	43	54	3
M-HuRko (lys 7237 )	46.6	48.9	4.5
M-HuRko (lys 7238 )	28	69	3
M-HuRko (lys 7240 )	53	44	3
M-HuRko (lys 7496)	71	26	3
M-HuRko (lys 7524 )	37	60	3
M-HuRko (lys 7525)	43	56	1
M-HuRko (lys 14)	42	52	6
Control (fl/fl 7310)	64.5	31.8	3.7
Control (fl/fl 7327)	9	88	3
Control (fl/fl 7319)	62	31	7
Control (fl/fl 7324)	33	59	8
Control (fl/fl 7326)	40	51	9
Control (fl/fl 7437 )	57	37	6
Control (fl/fl 7440 )	52	46	2
Control (fl/fl 7491)	4.5	92.9	2.6
Control (fl/fl 12 )	39.2	57.4	3.4
IEC-HuRko (vill7313)	62	32	6
IEC-HuRko (vill7315 )	41.4	55.2	3.4
IEC-HuRko (vill7321)	46	50	4
IEC-HuRko (vill7322)	71	24	5
IEC-HuRko (vill7434)	28.3	58.5	13.2
IEC-HuRko (vill7436)	58	39	3
Tg- (wt 7279 )	45	50	5
Tg- (wt 7281)	50	47	3
Tg- (wt 7288)	67.7	25.8	6.5
Tg- (wt 7337)	41	49	10
Tg- (wt 7338)	44	38	18
Tg- (wt 7481)	57	41	2
Tg- (wt 7532 )	26	72	2
Tg- (wt 7533 )	58.5	39.5	2
Tg+ (tg 7282)	26	66	8
Tg+ (tg 7290)	69.7	26.6	3.7
Tg+ (tg 7335)	30	62	8
Tg+ (tg 7427)	24.3	72.4	3.3
Tg+ (tg 7425)	28	69	3
Tg+ (tg 7478)	39	57	4



**Γράφημα 7.7:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται τα ποσοστά PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes* (μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα), *Proteobacteria* (πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την 10η και 9η ημέρα, αντίστοιχα

**Πίνακας 7.13:** Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την 10η και 9η ημέρα, αντίστοιχα

Γονότυποι / Ομάδες	<i>Bacteroidetes</i> PSM%		<i>Firmicutes</i> PSM%		<i>Proteobacteria</i> PSM%	
	Average	SD	Average	SD	Average	SD
M-HuRko (lys)	46.4	12.1	50.3	12.1	3.5	1.3
Control (fl/fl)	40.1	21.8	54.9	22.6	5.0	2.6
IEC-HuRko (vill)	51.1	15.5	43.1	13.7	5.8	3.8
Tg- (wt)	48.7	12.8	45.3	13.3	6.1	5.6
Tg+ (tg)	36.2	17.2	58.8	16.7	5.0	2.3

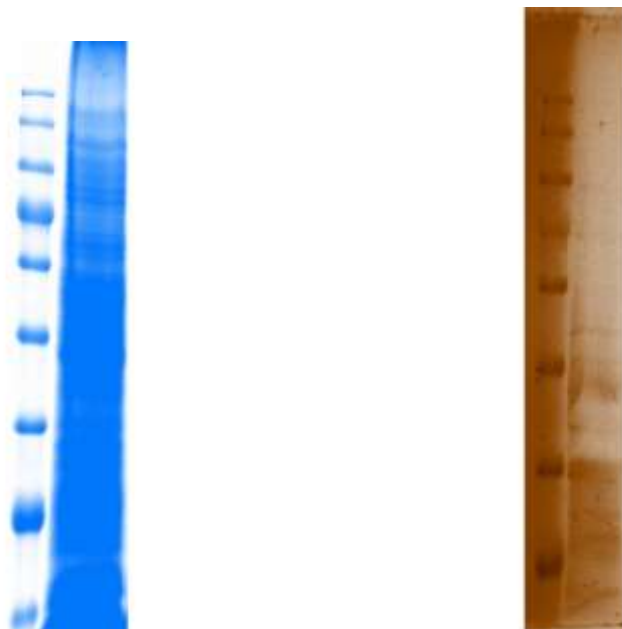


**Γράφημα 7.8:** Γράφημα τύπου 100% συσσωρευμένη στήλη σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου απεικονίζονται οι μέσοι όροι των ποσοστών PSM (επί τοις %) των βακτηριακών φύλων *Bacteroidetes*(μπλε χρώμα), *Firmicutes* (κόκκινο χρώμα) , *Proteobacteria*(πράσινο χρώμα) στα δείγματα κοπράνων 1ης και 3ης ομάδας πειραμάτων, την 10η και 9η ημέρα, αντίστοιχα

### 7.3 Πρωτεωμική ανάλυση του βακτηρίου *Citrobacter rodentium*

Με σκοπό την ανάλυση ολόκληρου του πρωτεώματος του βακτηρίου *C.rodentium* λάβαμε στερεή καλλιέργεια, η οποία υπέστη επεξεργασία όπως περιγράφεται στην ενότητα 6.5.

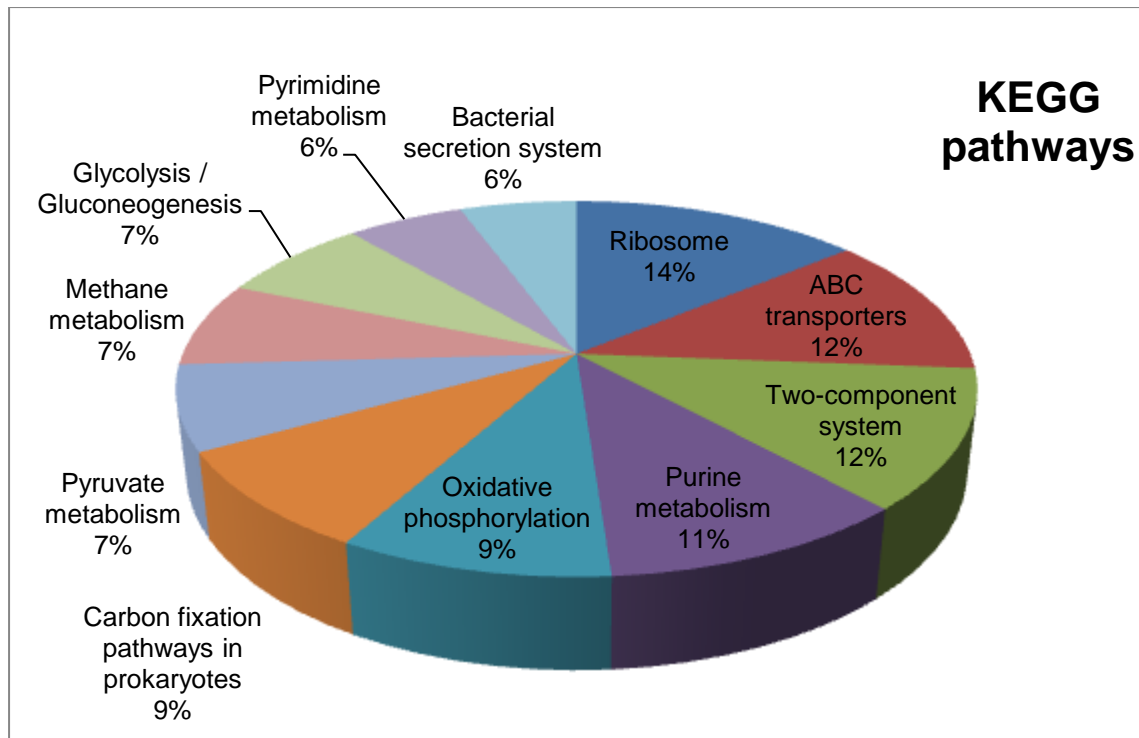
Αρχικά, με τις διαφορετικές χρώσεις στα SDS-PAGE ηλεκτροφορήματα διαπιστώσαμε ότι η διαδικασία επεξεργασίας που ακολουθήθηκε δίνει ικανοποιητικά πρωτεϊνικά δείγματα.



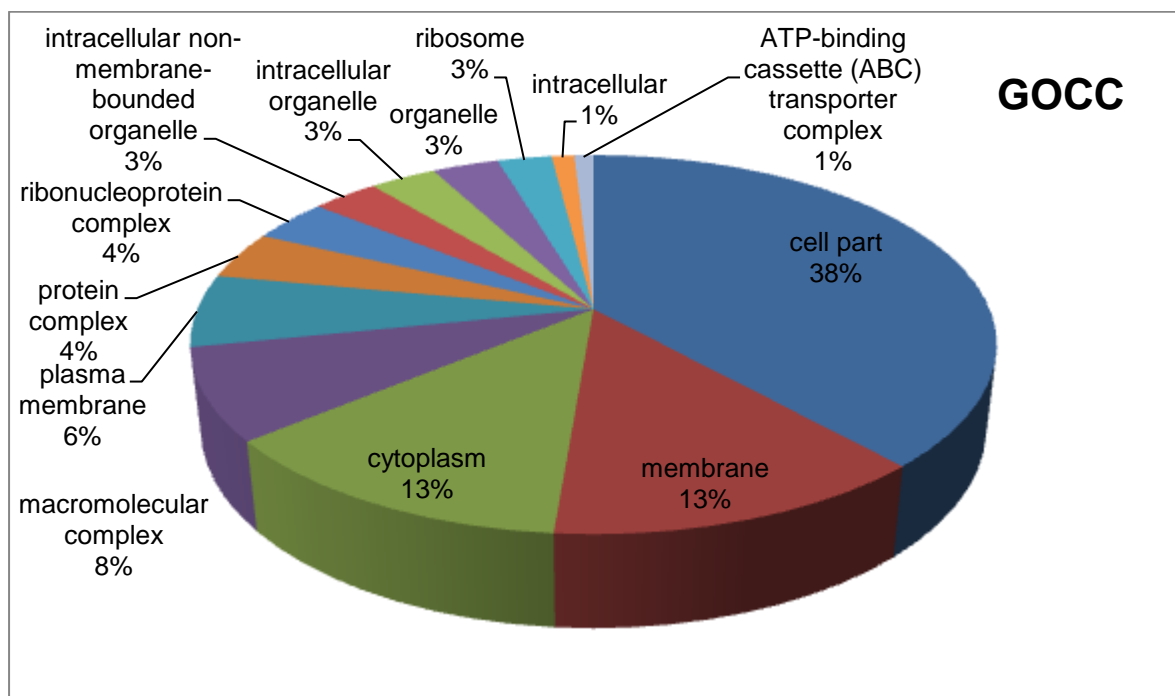
**Εικόνα 7.12 :** **Αριστερά :** Χρώση “Blue Silver” Coomassie Colloidal Blue στο SDS-PAGE ηλεκτροφόρημα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της στερεής καλλιέργειας *C.rodentium*. **Δεξιά :** Χρώση Νιτρικού Αργύρου (Silver nitrate) στο SDS-PAGE ηλεκτροφόρημα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος της στερεής καλλιέργειας *C.rodentium*.

Ακολούθως, η ανάλυση μέσω του άξονα UHPLC-MS/MS – MaxQuant – Perseus (όπως περιγράφεται στις μεθόδους ενότητας 6.6 και 6.7) καταλήγει σε λίστα πρωτεϊνών / γονιδίων με 897 καταχωρήσεις. Τέλος, αυτές ταξινομούνται με βάση τους σχολιασμούς / ονομασίες GOBP, GOMF, GOCC, KEGG σε διαγράμματα με τη βοήθεια και τις γνώσεις προγραμματισμού του Δρ. Γ. Α. Παυλόπουλου, βασικού ερευνητή και επικεφαλή της βιοπληροφορικής (Β' βαθμός - Αναπληρωτής Καθηγητής) του Κέντρου Ερευνών Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" (BSRC "Alexander Fleming").

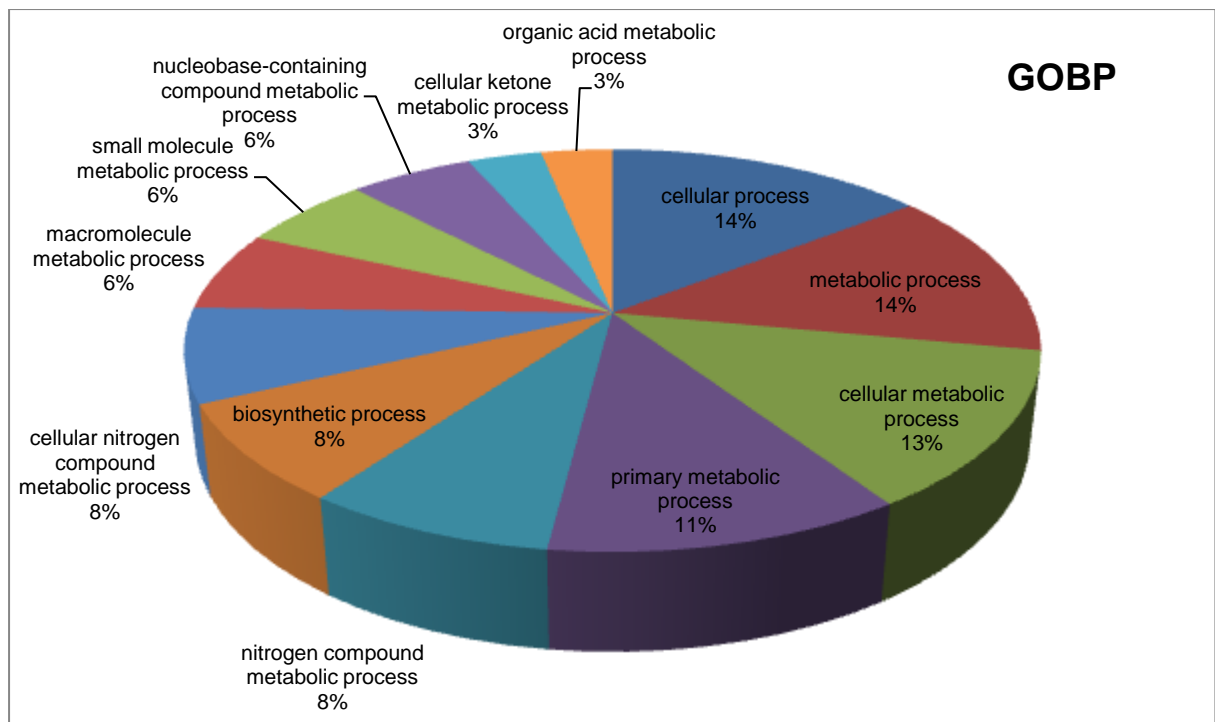




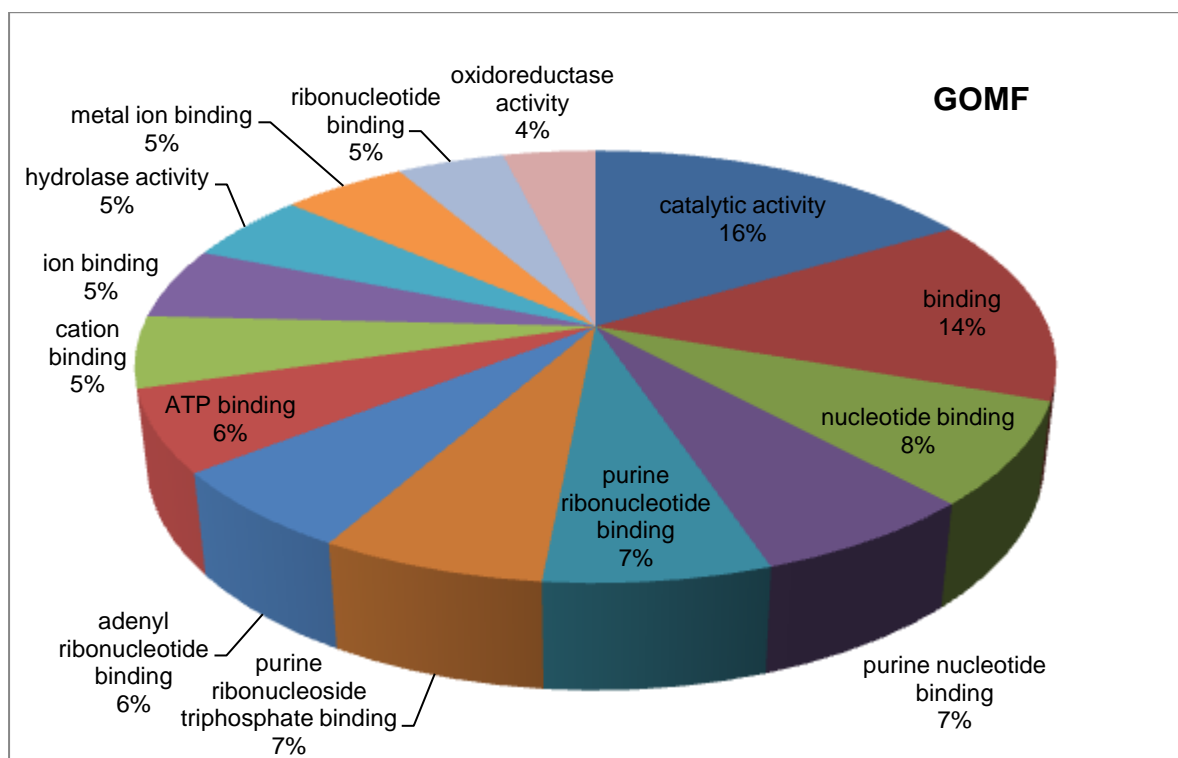
**Γράφημα 7.9:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε KEGG pathways του πρωτεόματος του *C.rodentium*.



**Γράφημα 7.10:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε GOCC του πρωτεόματος του *Citrobacter rodentium*



**Γράφημα 7.11:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε GOBP του πρωτεόματος του *C.rodentium*



**Γράφημα 7.12:** Γράφημα τύπου πίτας σε τρεις διαστάσεις (3-D), όπου αναπαριστά την κατάταξη σε GOMF του πρωτεόματος *C.rodentium*

## 8 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup> ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας παρατηρήθηκαν αρκετές αλλαγές τόσο στις πρωτεΐνες του ξενιστή/ποντικού όσο και στους πληθυσμούς βακτηρίων του εντερικού μικροβιώματος.

### 8.1 Πρωτεΐνες ξενιστή

Αρχικά, έχοντας ασχοληθεί με την ανάλυση των μεταβολών του πρωτεώματος του ξενιστή/ποντικού, επικεντρωθήκαμε στη διερεύνηση του ρόλου ορισμένων στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών, που ανιχνεύονταν επαναλαμβανόμενα σε παραπάνω από ένα δείγματα και εμφάνιζαν κάποιο βιολογικό ενδιαφέρον.

#### 8.1.1 GDP-mannose-4, 6-dehydratase

1) Συμμετοχή στο χημικό μονοπάτι που οδηγεί από την D-mannose στην D-mannose-6-phosphate και εν συνεχεία στη D-fructose-6-phosphate ή στο σχηματισμό GDP-L-fucose.

Τα μολυσμένα από *C.rodentium* επιθηλιακά εντεροκύτταρα εμφανίζουν ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως “Warburg effect”. Αντικαθιστούν την παραγωγή ενέργειας από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια σε αερόβια γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα, διαδικασία που είναι μη-αντιστρεπτή (μόνιμη βλάβη των μιτοχονδρίων). Το *C.rodentium* αυξάνει τον μεταφορέα σακχάρων *Sglt4* (μαννόζη, φρουκτόζη) τροφοδοτώντας έτσι την αερόβια γλυκόλυση<sup>(46,134)</sup>. Η GDP, υπερεκφρασμένη, εμπλέκεται στην αυξημένη ζήτηση για μαννόζη. Πράγματι, στο πείραμα μας (Εικόνες 7.1.2, 7.2.2, 7.3.2) τα μυελοειδή κύτταρα και τα επιθηλιακά εντεροκύτταρα την υπερεκφράζουν όταν δεν εκφράζουν την HuR. Αντίθετα, όταν υπερεκφράζεται η HuR (Tg+) εμφανίζεται να υπο-εκφράζεται σε σχέση με τα Tg- (προστατευτική δράση).

2) Καταρράκτης σημάτων που ξεκινά με εξωκυτταρική σύνδεση σε υποδοχέα NOTCH στην επιφάνεια κυτάρου στόχου και τελειώνει με κυτταρικές διαδικασίες, όπως μεταγραφή.

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ύπαρξης λειτουργικής ενδοεπικοινωνίας μεταξύ υποδοχέων NOTCH, στη δομή του οποίου συμβάλλει η GDP-mannose-4, 6-dehydratase με NF-κB σε υπερπλαστικό (μη-νεοπλασματικό) επιθήλιο του εντέρου. Οι Ahmed et al., 2013<sup>(135)</sup> έδειξαν οξεία παρεμπόδιση του μονοπατιού NOTCH την 6<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα λοίμωξης με *C.rodentium* δεν επηρεάζει το NF-κB σηματοδοτικό μονοπάτι. Πράγματι, στο πείραμά μας στα Tg+ ποντίκια, που υπερεκφράζουν τη HuR, ενώ η GDP-mannose-4, 6-dehydratase υποεκφράζεται (Εικόνα 7.1.2) (συσχέτιση με Notch υποδοχέα), η

κυσταθειονάση (κυσταθειονίνη-γ-λυάση / cystathionine-gamma-lyase, cystathionase) υπερεκφράζεται όπως αναλύεται και παρακάτω (συσχέτιση με NF-κB μονοπάτι).

### **8.1.2 Κυσταθειονάση (κυσταθειονίνη-γ-λυάση / cystathionine-gamma-lyase, cystathionase/ Cth or Cse)**

Μεταφραστικός παράγοντας : ρυθμίζει γονίδια τόσο φυσικής όσο και προσαρμοστικής ανοσιακής απάντησης.

Η Cth υπερεκφράζεται στα Tg+, που υπερεκφράζουν τη HuR, καθώς και στα ποντίκια που στερούνται HuR στα κύτταρα εντερικού επιθηλίου (Εικόνες 7.1.2 και 7.3.2). Γνωρίζουμε<sup>(43)</sup> ότι στη λοίμωξη με *C.rodentium* οδηγούμαστε σε ενεργοποίηση του MYD88 – dependent Toll-like receptor (TLR) σηματοδοτικού μηχανισμού που στη συνέχεια δραστηριοποιεί τον NF-κB (φυσική και προσαρμοστική ανοσία). Ασκεί θετική-ευοδωτική ρύθμιση στη δραστηριότητα του NF-κB. Επομένως, έχουμε ευρήματα συμβατά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

### **8.1.3 Καρβοξυλεστεράσες: Carboxylesterase-1C (Ces1c) και Carboxylesterase-2C (Ces2c)**

Οι καρβοξυλεστεράσες υδρολύουν ένα ευρύ φάσμα ξενοβιοτικών και ενδογενών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και των λιπιδικών εστέρων. Οι δράσεις τους είναι καλά τεκμηριωμένες ως προς τον λιπιδαιμικό μεταβολισμό των θηλαστικών. Στο ποντίκι 20 καρβοξυλεστεράσες ≈60kDa που οργανώνονται σε 5 ισοενζυμικές τάξεις. Η Ces1 οικογένεια αριθμεί 8 μέλη από Ces1 έως Cesh όπως επίσης και η Ces2 οικογένεια. Οι Jones et al.,2013<sup>(136)</sup> εντοπίζουν την έκφραση της Ces1c σχεδόν αποκλειστικά στο ήπαρ. Αντίθετα η Ces2 εντοπίζεται κυρίως στο έντερο με φθίνουσα κατανομή από το δωδεκαδάκτυλο στο κόλον. Οι Lian et al.,2018<sup>(137)</sup> υπογραμμίζουν ότι η Ces1c έχει επίσης την ικανότητα να εκκρίνεται στον εντερικό αυλό. Οι Xu et al.,2014<sup>(138)</sup> συμπεραίνουν ότι η Ces1 διαδραματίζει κομβικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων, αποδεικνύοντας πειραματικά ότι η αποσυναρμολόγηση της, αυξάνει στα ποντίκια τα ηπατικά τριγλυκερίδια και τη χοληστερόλη ορού. Οι Berger et al.,2017<sup>(46)</sup> έδειξαν ότι η λοίμωξη με *C.rodentium* διεγείρει ταυτόχρονα τη βιογένεση χοληστερόλης και εκροή της από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Υποστηρίζουν ότι το *C.rodentium* αυξάνοντας την εκροή της χοληστερόλης από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου μετριάζει την σηματοδότηση μέσω TLR4. Οι Collins et al.,2014<sup>(43)</sup> τονίζουν ότι αυτή η οδός, MYD88→TLR4, ελέγχει την λοίμωξη με *C.rodentium* αξιοποιώντας τουλάχιστον τρεις μηχανισμούς : 1) επιστράτευση ουδετερόφιλων, μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων του βλεννογόνου, 2)

έκφραση της επαγόμενης συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (iNOS) και 3) πυροδότηση της «κολονικής υπερπλασίας» (πολλαπλασιασμός επιθηλιακών κυττάρων). Κατά τους Khan et al.,2006<sup>(139)</sup>, στην ουσία δεν προσφέρει στην άμυνα του ξενιστή, παρά μόνο συμβάλλει στην δημιουργία κολίτιδας. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Buschor et al.,2017<sup>(48)</sup> η απάντηση μέσω TLR4 ευνοεί τον αποικισμό του εντέρου με *C.rodentium*. Στα αρχικά στάδια (πρώτες 18 ώρες), η χαμηλής έντασης φλεγμονή προσφέρει πλεονεκτήματα στο παθογόνο. Οι Berger et al.,2017<sup>(46)</sup> αναφέρουν την ανεύρεση αυξημένης ποσότητας χοληστερόλης στα κόπρανα ποντικών μολυσμένων με *C.rodentium*. Στο πείραμα μας διαπιστώνουμε :

- Down regulation της *Ces1c* τόσο στα ποντίκια M-HuRko όσο και στα IEC-HuRko, σε σύγκριση με τα Controls τους (Εικόνες 7.2.2 και 7.3.2) και απουσία της *Ces2* στα συγκεκριμένα δείγματα.
- Αντίθετα στα M-HuRko(9) και IEC-HuRko(9) (της 9<sup>ης</sup> μέρας και σε σύγκριση με τα M-HuRko(0) και IEC-HuRko(0), αντίστοιχα) η *Ces2c* παρουσιάζεται upregulated (Εικόνες 7.10.2 και 7.11.2), ενώ η *Ces1c* απουσιάζει.

#### 8.1.4 Colipase (Clps)

Συνένζυμο για τη βέλτιστη λειτουργία της παγκρεατικής λιπάσης. Εκκρίνεται σαν προένζυμο που στο έντερο ενεργοποιείται με θρυψίνη. Προστατεύει, από την ανασταλτική δράση των χολικών αλάτων, την παγκρεατική λιπάση, η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια μακράς αλυσίδας της διατροφής, εντός του δωδεκαδάκτυλου. (Εικόνες 7.2.2 και 7.3.2)

#### 8.1.5 Κρεατινική Κινάση τύπου U, μιτοχονδριακή (Creatine kinase U type, mitochondrial – Ckmt1)

- Κεντρικό ένζυμο για την ενέργεια κυττάρου

Είναι το μιτοχονδριακό ένζυμο που μετατρέπει την κρεατίνη σε φωσφορική κρεατίνη. Η βιογένεση της κρεατίνης γίνεται από την L-αργινίνη με το ένζυμο Gatm (glycine aminotransferase). Η αργινίνη όμως, αποτελεί και υπόστρωμα για την παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO) με το ένζυμο NO συνθετάση (NOS). Η ισομορφή του, iNOS (immune response NOS), εμπλεκόμενη στις ανοσολογικές απαντήσεις παράγει NO, το οποίο δρα ως ισχυρό βακτηριοκτόνο. Οι Berger et al.,2017<sup>(46)</sup> προτείνουν το εξής μοντέλο ερμηνείας της δράσης του *C.rodentium*. Αυτό διαταράσσει σοβαρά και ανεπανόρθωτα την μιτοχονδριακή λειτουργία, έτσι ώστε να στρέψει την υπάρχουσα ποσότητα L-αργινίνης σε παραγωγή κρεατίνης, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή του βλαπτικού, για αυτό, οξειδίου του αζώτου (NO). Πράγματι, στο πείραμά μας, η *Ckmt1* υπερεκφράζεται στα ποντίκια IEC-HuRko συγκριτικά με τα Control την 10η ημέρα (Εικόνα 7.3.2), ενώ αντίθετα υπο-εκφράζεται στα

Tg+(ημέρα 9<sup>η</sup>), τόσο στη σύγκριση με τα ίδια από την μέρα 0 (Tg+\_0)(Εικόνα 7.8.2) , όσο και με τα Tg-(ημέρα 9<sup>η</sup>) (Εικόνα 7.4.2).

## 8.2 Μεταβολές στα βακτηριακά φύλα του εντερικού μικροβιώματος

Η ταξονομική σύνθεση και η σχετική ποσοτική αναλογία των μικροβίων στο εντερικό μικροβίωμα έχουν τεράστιο ενδιαφέρον στην υγεία και ασθένεια του ανθρώπου<sup>(140)</sup>. Πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια χρησιμοποιούνται με αυξανόμενο ρυθμό στη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος<sup>(141)</sup>. Η μετα-πρωτεωμική ανάλυση του εντερικού μικροβιώματος επιτρέπει μια αρτιότερη εξερεύνηση του, προσφέροντας συγχρόνως εξαιρετικές δυνατότητες μελέτης των λειτουργιών του, όπως αυτές εκφράζονται σε συνάρτηση με τον ίδιο τον ξενιστή, τη διατροφή ή άλλο περιβαλλοντικό ερέθισμα<sup>(142)</sup>. Παρά τη σχετικά πρόσφατη ανάπτυξη εξειδικευμένων εργαλείων που επιτρέπουν την αξιόπιστη ανίχνευση ταξονομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών του πρωτεώματος, η μετα-πρωτεωμική ανάλυση δεδομένων εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση. Ένα από τα πιο κρίσιμα βήματα είναι η επιλογή των κατάλληλων βάσεων δεδομένων (databases) πρωτεϊνών για ταυτοποίηση των φασμάτων μάζας. Η αντιστοίχιση των πειραματικών φασμάτων μάζας από το προς μελέτη δείγμα με τα θεωρητικά φάσματα που έχουν εξαχθεί *in silico* από μια βάση δεδομένων αλληλουχιών. Αφορά χιλιάδες μικροβιακά είδη , για αρκετά από τα οποία δεν είναι δημόσια διαθέσιμες πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Οι Tanca et al.,2016<sup>(142)</sup> προβαίνουν σε μια συστηματική αξιολόγηση της σημασίας των βάσεων δεδομένων αλληλουχιών στα μετα-πρωτεομικά αποτελέσματα εντερικού μικροβιώματος στα ποντίκια.

- 1) Οι πειραματικές μετα-γενομικές βάσεις δεδομένων οδηγούν σε διαφορετικές ανιχνεύσεις μικροβιώματος εντέρου σε σχέση με τις «ψευδο-μετα-γενωμικές» βάσεις (π.χ. Uniprot).
- 2) Οι «ψευδο-μετα-γενωμικές» βάσεις δεδομένων εμφανίζουν σοβαρούς περιορισμούς στο εντερικό μικροβίωμα πειραματικού μοντέλου ποντικών. Αυτό δεν ισχύει για τις μελέτες μικροβιώματος ανθρώπων.
- 3) Οι ταξονομικές καταχωρίσεις σε μετα-πρωτεομικές μελέτες ποντικών δείχνουν να υφίστανται ισχυρό bias ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη βάση δεδομένων (DB-dependent bias).
- 4) Ο μετα-πρωτεομικός λόγος *Firmicutes/Bacteroidetes* επηρεάζεται σημαντικά από τη βάση δεδομένων που χρησιμοποιείται κάθε φορά, ειδικά στις μελέτες ποντικών. Παραδείγματος χάρη, χρησιμοποιώντας Unipept, όπως εμείς, βρίσκουν 25% των taxa να αλλάζουν στατιστικώς σημαντικά ως προς την ποσότητα αφφονίας (abundance), ενώ σε αντίστοιχες με ανθρώπους μόνο 2%. Με δεδομένο ότι οι αλλαγές του λόγου *Firmicutes/Bacteroidetes* μακροπρόθεσμα έχουν χρησιμοποιηθεί ως συνθετικός δείκτης «δυσβίωσης». Οι Tanca et al.,2016<sup>(142)</sup> υπογραμμίζουν ότι στην εκτίμηση του πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν το σοβαρό bias από την

βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα, στα ποντίκια μπορεί να υπάρξουν διαφορές μεγαλύτερες του δεκαπλάσιου. Δυστυχώς, παρόμοια biases ισχύουν και για το λόγο (ratio) αυτό στους ανθρώπους. Αυτό εξηγεί τα τελείως αντικρουόμενα βιβλιογραφικά αποτελέσματα<sup>(140)</sup>.

- 5) Οι λειτουργικές καταχωρίσεις (annotations) στις μετα-πρωτεωμικές μελέτες του εντέρου ποντικών είναι επίσης εξαρτώμενες από την εκάστοτε βάση που χρησιμοποιείται.

Οι Tanca et al.,2016<sup>(142)</sup> προτείνουν ως στρατηγική υπερπήδησης αυτών των αδυναμιών την παράλληλη χρησιμοποίηση πολλαπλών βάσεων δεδομένων. Συμπεραίνουν : « Από γενική άποψη και πρακτική προοπτική ο σχεδιασμός της βάσης ανάλυσης δεδομένων σε μια έρευνα εντερικού μικροβιώματος πρέπει να στοχεύει σε ένα συμβιβασμό μεταξύ ευαισθησίας και βάθους πληροφορίας αφ' ενός και δαπάνη σε υπολογιστική προσπάθεια και χρόνο από την άλλη».

Στο πείραμά μας (Πίνακες 7.10,11,12,13 και αντίστοιχα Γραφήματα 7.5,6,7,8) διαπιστώνουμε σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία<sup>(141)</sup> ότι το μικροβίωμα των ποντικών κυριαρχείται από δύο μεγάλα φύλα *Bacteroidetes* και *Firmicutes*. Επίσης, διαπιστώνεται ότι μεταξύ της ημέρας μηδέν (0) (uninfected) και 9<sup>ης</sup> – 10<sup>ης</sup> (infected) τα ποσοστά των *Bacteroidetes* αυξάνονται σε όλους τους γονότυπους. Το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης παρατηρείται στο γονότυπο IEC-HuRko (32.95%). Παράλληλα, παρατηρείται αντίστοιχη μείωση των *Firmicutes*. Ακόμη, καταγράφεται αύξηση του φύλου των *Proteobacteria*. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Morgan et al.,2012<sup>(18)</sup> οι οποίοι διαπιστώνουν σε ασθενείς με IBD : 1) μείωση των *Firmicutes* και 2) αύξηση των *Proteobacteria*. Αξίζει να σημειωθεί πως ο Nguyen<sup>(141)</sup> υπογραμμίζει ότι οι μεγάλες διακυμάνσεις στο εντερικό μικροβίωμα που έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα μοντέλα κολίτιδας σε ποντίκια είναι παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται σε ανθρώπινες IBD μελέτες.

### 8.3 Αντιπροσωπευτικότητα και αναπαραγωγιμότητα

Αρχικά, όσον αφορά στην διαλογή και προετοιμασία των δειγμάτων γενικά στις μετα-ωμικές αναλύσεις έχει αναφερθεί ότι όσο πιο ετερογενές είναι ένα σύστημα (ή οι απαντήσεις εξαιτίας των πειραματικών χειρισμών) τόσο μεγαλύτερη είναι και η ανάγκη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων<sup>(143)</sup>. Με βάση το συλλογισμό ότι οι βιολογικές επαναλήψεις διασφαλίζουν την αντιπροσωπευτικότητα και οι τεχνικές επαναλήψεις την αναπαραγωγιμότητα, προτείνεται η χρήση 3-6 βιολογικών και τουλάχιστον 3 τεχνικών επαναλήψεων<sup>(144)</sup>. Συνεχίζοντας, και πιο συγκεκριμένα στην πρωτεωμική, οι Oberg και Vitek<sup>(145)</sup> υπογραμμίζουν ότι ο επιτυχής πειραματικός σχεδιασμός θα πρέπει να ικανοποιεί στα πειράματα πρωτεωμικής με MS δύο στόχους: α) Να διασφαλίζει τα στατιστικά συμπεράσματα αποφεύγοντας, όσο είναι

δυνατό, τα συστηματικά σφάλματα και β) να εξασφαλίζει ότι το πείραμα είναι επαρκές, ελαχιστοποιώντας τις τυχαίες διακυμάνσεις.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία επιλέχθηκε σχεδιασμός δίχως τεχνικές επαναλήψεις, κυρίως για την ελάττωση του συνολικού χρόνου πειραμάτων, καθώς επίσης ακολουθήθηκε τυχαία σειρά στην προετοιμασία των δειγμάτων και στην λήψη των φασμάτων. Ο Breen<sup>(146)</sup> τεκμηριώνει ότι η μη χρήση τεχνικών επαναλήψεων σε ένα πείραμα δεν αλλάζει δραστικά την αναμενόμενη συνολική διακύμανση της ανάλυσης, ιδιαίτερα δε, για μικρό αριθμό δειγμάτων (<10). Επιπλέον, οι Oberg και Vitek<sup>(145)</sup> απέδειξαν ότι αυξάνοντας τον αριθμό των βιολογικών επαναλήψεων επιτυγχάνεται ακριβέστερη εκτίμηση των αληθινών βιολογικών διαφορών μεταξύ των ομάδων. Γνωρίζοντας ότι οι ελάχιστες απαιτούμενες βιολογικές επαναλήψεις είναι 3(τρεις) στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν από 3 μέχρι και 8 σε ορισμένους γονότυπους/ομάδες. Αξιοποιώντας όλα τα παραπάνω λοιπόν, καταλήγουμε πως τα αποτελέσματά μας είναι αντιπροσωπευτικά.

#### **8.4 Επίλογος – Συμπεράσματα**

Η μετα-πρωτεωμική ανάλυση εντερικού μικροβιώματος ποντικού αποδεικνύεται εξαιρετικά αποτελεσματική στη φυλογενετική ταξινόμηση στο μοντέλο φλεγμονής από *Citrobacter rodentium*. Επιπλέον, ο ρόλος της στην αποκάλυψη παθογενετικών μηχανισμών σε αυτό το μοντέλο λοίμωξης είναι καταλυτικός όσον αφορά στην κατανόηση των σχέσεων μεταξύ μικροβιώματος και ξενιστή. Τέλος, η βελτιστοποίηση των εργαλείων της μετα-πρωτεωμικής ανάλυσης προσφέρει προοπτικές εμβάθυνσης στη μελέτη των δράσεων του μικροβιώματος σε νοσολογικές οντότητες.



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ – ΟΡΟΛΟΓΙΕΣ

E.K.P.A.	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
E.KE.B.E	Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊοντικών Επιστημών
SCFAs	Short-Chain Fat Acids / λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας
IBD	Inflammatory Bowel Disease / φλεγμονώδης εντερική νόσος
MALT	Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue
MDSCs	Myeloid Derived Suppressor Cells
LPS	LipoPolySaccharides / Λιποπολυσακχαρίτες
BCG	Bacillus Colmette-Guerin
MS	Mass Spectrometry / Φασματομετρία Μάζας
LC	Liquid Chromatography / Υγρή Χρωματογραφία
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
TOF	Time Of Flight
NGS	Next Generation Sequencing
PRO-IQ	Proteome Identification and Quantification
EPEC	Enteropathogenic Escherichia Coli
EHEC	Enterohemorrhagic Escherichia Coli
RBPs	Ριβονουκλειοπρωτεΐνες
AREs	AU-rich elements
MLI	Mucosal Luminal Interface
DF	Double Filtering
PBS	Phosphate Buffer Saline
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PAGE	Poly-Acrylamide Gel
DTT	Dithiothreitol
CMC	Critical Micelle Concentration
MMW	Micelle Molecular Weight
ISD	In Solution Digestion
IGD	In Gel Digestion
OFD	On Filter Digestion
OPD	On Pellet Digestion
FASP	Filter Aided Sample Preparation
MED-FASP	Multiple Enzyme Digestion – FASP
SP3	Single Pot – Solid Phase – Sample Preparation
MCPs	Partially Cleaved Peptides
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra – HPLC
ESI	Electro-Spray Ionization
MB	Μοριακό Βάρος
IT	Ion Trap
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
AUC	Area Under the Curve
SC	Spectral Counting
PAI	Protein Abundance Index
emPAI	Exponentially modified – PAI
APEX	Absolute Protein Expression
RIBAR	Robust Intensity-Based Averaged Ratio
MCAR	Missing Completely At Random
MNAR	Missing Not-At Random

FDR	False Discovery Rate
LCA	Lowest Common Ancestor
GO	Gene Ontology
CC	Cellular Components
MF	Molecular Functions
BP	Biological Processes

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Van Den Elsen LWJ, Poyntz HC, Weyrich LS, Young W, Forbes-Blom EE. Embracing the gut microbiota: The new frontier for inflammatory and infectious diseases. *Clinical and Translational Immunology*. 2017;6(1):e125-9.
2. Μεντής ΑΦ. REVIEW Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο. 2013;
3. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6(10):776–88.
4. Sharpton TJ. Role of the Gut Microbiome in Vertebrate Evolution. *mSystems*. 2018;3(2):e00174-17.
5. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative medicine (Encinitas, Calif)*. 2014;13(6):17–22.
6. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Kling Bäckhed H, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012;150(3):470–80.
7. Amon P, Sanderson I. What is the microbiome? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*. 2017;102(5):258–61.
8. Sartor RB. Diet promotes dysbiosis and colitis in susceptible hosts. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012;9(10):561–2.
9. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012;9(10):565–76.
10. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012;9(10):577–89.
11. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. *European Journal of Nutrition*. 2018;57(S1):1–14.
12. Zhang X, Deeke SA, Ning Z, Starr AE, Butcher J, Li J, et al. Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nature Communications*. 2018;9(1):1–14.
13. Mao L, Franke J. Symbiosis, dysbiosis, and rebiosis-The value of metaproteomics in human microbiome monitoring. *Proteomics*. 2015;15(5–6):1142–51.
14. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical*

- Journal of Gastroenterology. 2018;11(1).
15. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012;338(6103):120–3.
  16. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: Beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(8):575–82.
  17. Gillings MR, Paulsen IT, Tetu SG. Ecology and evolution of the human microbiota: Fire, farming and antibiotics. *Genes*. 2015;6(3):841–57.
  18. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward D V, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*. 2012;13(9):R79.
  19. Aron-Wisnewsky J, Doré J, Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012;9(10):590–8.
  20. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2017;14(2):79–87.
  21. Ray K. Colorectal cancer - Driven by inflammation and gut bacteria? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2012;9(10):558.
  22. Goodman B, Gardner H. *The microbiome and cancer* Brian Goodman and Humphrey Gardner Evelo Biosciences , Cambridge MA, USA. 2018;
  23. Κυριαζής ΙΔ, Καμπούρης ΜΕ, Πουλάς Κ, Πατρινός ΓΠ. Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών.
  24. Yildirim Ibrahim. Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;1(1):42–6.
  25. Ari, Sule; Arikan M. *Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future*. 2016.
  26. Gutleben J, Chaib De Mares M, van Elsas JD, Smidt H, Overmann J, Sipkema D. The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Critical Reviews in Microbiology*. 2018;44(2):212–29.
  27. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(1):237–64.
  28. Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, Ndongo S, Dione N, Hugon P, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology*. 2016;1(November).
  29. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of

- flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(11):4015–21.
30. Grégory D, Chaudet H, Lagier J-C, Raoult D. How mass spectrometric approaches applied to bacterial identification have revolutionized the study of human gut microbiota. *Expert Review of Proteomics*. 2018;0(0):1–13.
  31. Amrane S, Raoult D, Lagier JC. Metagenomics, culturomics, and the human gut microbiota. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2018;16(5):373–5.
  32. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, Kumar N, Neville BA, Stares MD, et al. Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*. 2016;533(7604):543–6.
  33. Yang FR. A comparison of next-generation sequencing protocols for microbial profiling. 2016.
  34. Mendez-Garcia, Celia; Barbas, Coral; Ferrer, Manuel; Rojo D. Complementary Methodologies To Investigate Human Gut Microbiota in Host Health, Working towards Integrative Systems Biology. 2018;1–13.
  35. Kolmeder CA. Metaproteomics of the Human Intestinal Tract to Assess Microbial Functionality and Interactions with the Host. 2015.
  36. D’Argenio V. Human microbiome acquisition and bioinformatic challenges in metagenomic studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2):1–12.
  37. Lee PY, Chin S-F, Neoh H, Jamal R. Metaproteomic analysis of human gut microbiota: where are we heading? *Journal of Biomedical Science*. 2017;24(1):36.
  38. Zhang X, Ning Z, Mayne J, Moore JI, Li J, Butcher J, et al. MetaPro-IQ: A universal metaproteomic approach to studying human and mouse gut microbiota. *Microbiome*. 2016;4:1–12.
  39. Yaoyang Zhang<sup>1,†</sup>, Bryan R. Fonslow<sup>1,†</sup>, Bing Shan<sup>1</sup>, Moon-Chang Baek<sup>1, 2</sup> and JRYI. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. 2014;113(4):2343–94.
  40. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-Throughput Proteomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2014;7(1):427–54.
  41. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch S V., Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*. 2018;24(4):392–400.
  42. Jin P, Wang K, Huang C, Nice EC. Mining the fecal proteome: from biomarkers to personalised medicine. *Expert Review of Proteomics*. 2017;14(5):445–59.
  43. Collins JW, Keeney KM, Crepin VF, Rathinam VAK, Fitzgerald KA, Finlay BB, et al. *Citrobacter rodentium*: Infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(9):612–23.

44. Petty NK, Bulgin R, Crepin VF, Cerdeno-Tarraga AM, Schroeder GN, Quail MA, et al. The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2010;192(2):525–38.
45. Deng W, De Hoog CL, Yu HB, Li Y, Croxen MA, Thomas NA, et al. A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of *Citrobacter rodentium*. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(9):6790–800.
46. Berger CN, Crepin VF, Roumeliotis TI, Wright JC, Carson D, Pevsner-Fischer M, et al. *Citrobacter rodentium* Subverts ATP Flux and Cholesterol Homeostasis in Intestinal Epithelial Cells In Vivo. *Cell Metabolism*. 2017;26(5):738–752.e6.
47. Mullineaux-Sanders C, Collins JW, Ruano-Gallego D, Levy M, Pevsner-Fischer M, Glegola-Madejska IT, et al. *Citrobacter rodentium* Relies on Commensals for Colonization of the Colonic Mucosa. *Cell Reports*. 2017;21(12):3381–9.
48. Buschor S, Cuenca M, Uster SS, Schären OP, Balmer ML, Terrazos MA, et al. Innate immunity restricts *Citrobacter rodentium* A/E pathogenesis initiation to an early window of opportunity. *PLoS Pathogens*. 2017;13(6):1–24.
49. Bhinder G, Sham HP, Chan JM, Morampudi V, Jacobson K, Vallance BA. The *Citrobacter rodentium* Mouse Model: Studying Pathogen and Host Contributions to Infectious Colitis. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(72):1–7.
50. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: Lessons from mouse infection models. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(8):564–77.
51. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Research*. 2012;21(2):327–49.
52. Liu L, Zhuang R, Xiao L, Chung HK, Luo J, Turner DJ, et al. HuR Enhances Early Restitution of the Intestinal Epithelium by Increasing Cdc42 Translation. *Molecular and Cellular Biology*. 2017;37(7):e00574-16.
53. Liu L, Christodoulou-Vafeiadou E, Rao JN, Zou T, Xiao L, Kyoung Chung H, et al. RNA-binding protein HuR promotes growth of small intestinal mucosa by activating the Wnt signaling pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 2014;25(21):3308–18.
54. Giammanco A, Blanc V, Montenegro G, Klos C, Xie Y, Kennedy S, et al. Intestinal epithelial HuR modulates distinct pathways of proliferation and apoptosis and attenuates small intestinal and colonic tumor development. *Cancer Research*. 2014;74(18):5322–35.
55. Starr AE, Deeke SA, Li L, Zhang X, Daoud R, Ryan J, et al. Proteomic and metaproteomic approaches to understand host-microbe

- interactions. *Analytical Chemistry*. 2018;90((1)):86–109.
56. Choo JM, Leong LEX, Rogers GB. Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. *Scientific Reports*. 2015;5:1–10.
  57. Wu WK, Chen CC, Panyod S, Chen RA, Wu MS, Sheen LY, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2018;
  58. Santiago A, Panda S, Mengels G, Martinez X, Azpiroz F, Dore J, et al. Processing faecal samples: A step forward for standards in microbial community analysis. *BMC Microbiology*. 2014;14(1):1–9.
  59. Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M. The madness of microbiome: Attempting to find consensus “best practice” for 16S microbiome studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018;84(7).
  60. McKain N, Genc B, Snelling TJ, Wallace RJ. Differential recovery of bacterial and archaeal 16S rRNA genes from ruminal digesta in response to glycerol as cryoprotectant. *Journal of Microbiological Methods*. 2013;95(3):381–3.
  61. Kolmeder CA, de Been M, Nikkilä J, Ritamo I, Mättö J, Valmu L, et al. Comparative metaproteomics and diversity analysis of human intestinal microbiota testifies for its temporal stability and expression of core functions. *PLoS ONE*. 2012;7(1).
  62. Kolmeder CA, Salojärvi J, Ritari J, De Been M, Raes J, Falony G, et al. Faecal metaproteomic analysis reveals a personalized and stable functional microbiome and limited effects of a probiotic intervention in adults. *PLoS ONE*. 2016;11(4):1–23.
  63. Tanca A, Palomba A, Pisanu S, Addis MF, Uzzau S. Enrichment or depletion? The impact of stool pretreatment on metaproteomic characterization of the human gut microbiota. *Proteomics*. 2015;15(20):3474–85.
  64. Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, Godzik A, Rosenquist M, Halfvarson J, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME Journal*. 2009;3(2):179–89.
  65. Wu J, Zhu J, Yin H, Liu X, An M, Pudlo NA, et al. Development of an Integrated Pipeline for Profiling Microbial Proteins from Mouse Fecal Samples by LC-MS/MS. *Journal of Proteome Research*. 2016;15(10):3635–42.
  66. Xiong W, Giannone RJ, Morowitz MJ, Banfield JF, Hettich RL. Development of an enhanced metaproteomic approach for deepening the microbiome characterization of the human infant gut. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(1):133–41.
  67. Hevia A, Delgado S, Margolles A, Sanchez B. Application of density

- gradient for the isolation of the fecal microbial stool component and the potential use thereof. *Scientific Reports*. 2015;5(April):1–9.
68. Tanca A, Palomba A, Pisanu S, Deligios M, Fraumene C, Manghina V, et al. A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization. *Microbiome*. 2014;2(1):1–16.
  69. Moon C, Stupp GS, Su AI, Wolan DW. Metaproteomics of Colonic Microbiota Unveils Discrete Protein Functions among Colitic Mice and Control Groups. *Proteomics*. 2018;18(3–4):1–10.
  70. McNulty NP, Wu M, Erickson AR, Pan C, Erickson BK, Martens EC, et al. Effects of Diet on Resource Utilization by a Model Human Gut Microbiota Containing *Bacteroides cellulosilyticus* WH2, a Symbiont with an Extensive Glycobiome. *PLoS Biology*. 2013;11(8).
  71. Manza LL, Stamer SL, Ham A-JL, Codreanu SG, Liebler DC. Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics*. 2005;5(7):1742–5.
  72. Wiśniewski JR. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Analytical Chemistry*. 2016;88(10):5438–43.
  73. Wiśniewski JR, Ostasiewicz P, Mann M. High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *Journal of Proteome Research*. 2011;10(7):3040–9.
  74. Wiśniewski JR, Zougman A, Mann M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(12):5674–8.
  75. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*. 2009;6(5):359–62.
  76. Klont F, Bras L, Wolters JC, Ongay S, Bischoff R, Halmos GB, et al. Assessment of Sample Preparation Bias in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Analytical Chemistry*. 2018;90(8):5405–13.
  77. Feist P, Hummon AB. Proteomic challenges: Sample preparation techniques for Microgram-Quantity protein analysis from biological samples. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):3537–63.
  78. Zhang X, Li L, Mayne J, Ning Z, Stintzi A, Figeys D. Assessing the impact of protein extraction methods for human gut metaproteomics. *Journal of Proteomics*. 2018;180:120–7.
  79. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 1996;68(5):850–8.
  80. Mann M. The rise of mass spectrometry and the fall of Edman



- degradation. Vol. 62, Clinical Chemistry. 2016. p. 293–4.
81. Hughes CS, Foehr S, Garfield DA, Furlong EE, Steinmetz LM, Krijgsveld J. Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Molecular Systems Biology*. 2014;10(10):757–757.
  82. Moggridge S, Sorensen PH, Morin GB, Hughes CS. Extending the Compatibility of the SP3 Paramagnetic Bead Processing Approach for Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2018;17(4):1730–40.
  83. Kanshin E, Thibault P. Efficient sample processing for proteomics applications — Are we there yet? *Mol Syst Biol*. 2014;1–3.
  84. Sielaff M, Kuharev J, Bohn T, Hahlbrock J, Bopp T, Tenzer S, et al. Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *Journal of Proteome Research*. 2017;16(11):4060–72.
  85. Tanca A, Biossa G, Pagnozzi D, Addis MF, Uzzau S. Comparison of detergent-based sample preparation workflows for LTQ-Orbitrap analysis of the *Escherichia coli* proteome. *Proteomics*. 2013;13(17):2597–607.
  86. Θωμαΐδης ΝΣ. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ - Αναλυτές Μαζών. 1-50 p.
  87. Θωμαΐδης ΝΣ. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ Πηγές Ιόντων. 1-66 p.
  88. Downard K. *Mass Spectrometry: A Foundation Course*. 2004;210.
  89. Hoffmann E De, Stroobant V. *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. Vol. 29, *Mass spectrometry reviews*. 2007. 945-61 p.
  90. Dolan JW. Ion Pairing - Blessing or Curse. *LCGC Europe*. 21(5):258–63.
  91. Karpievitch Y V, Dabney AR, Smith RD. Normalization and missing value imputation for label-free LC-MS analysis. *BMC bioinformatics*. 2012;13 Suppl 1(Suppl 16).
  92. Nahnsen S, Bielow C, Reinert K, Kohlbacher O. Tools for Label-free Peptide Quantification. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(3):549–56.
  93. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014;13(9):2513–26.
  94. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*. 2016;11(12):2301–19.
  95. Mackay KI. *A Comparative Study of Analysis Methods in Quantitative Label-free Proteomics by in Quantitative Label-free Proteomics*. University of Liverpool; 2015.
  96. Bondarenko P V, Chelius D, Shaler TA. Identification and relative

- quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002;74(18):4741–9.
97. Wang W, Zhou H, Lin H, Roy S, Shaler TA, Hill LR, et al. Quantification of Proteins and Metabolites by Mass Spectrometry without Isotopic Labeling or Spiked Standards. *Analytical Chemistry*. 2003 Sep;75(18):4818–26.
  98. Callister SJ, Barry RC, Adkins JN, Johnson ET, Qian W, Webb-Robertson B-JM, et al. Normalization Approaches for Removing Systematic Biases Associated with Mass Spectrometry and Label-Free Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2006 Feb;5(2):277–86.
  99. Lazar C, Gatto L, Ferro M, Bruley C, Burger T. Accounting for the Multiple Natures of Missing Values in Label-Free Quantitative Proteomics Data Sets to Compare Imputation Strategies. *Journal of Proteome Research*. 2016;15(4):1116–25.
  100. Ryu SY. Bioinformatics tools to identify and quantify proteins using mass spectrometry data. 1st ed. Vol. 94, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier Inc.; 2014. 1-17 p.
  101. Rykær M, Svensson B, Davies MJ, Hägglund P. Unrestricted Mass Spectrometric Data Analysis for Identification, Localization, and Quantification of Oxidative Protein Modifications. *Journal of Proteome Research*. 2017;16(11):3978–88.
  102. Elias JE, Gygi SP. Target-Decoy Search Strategy for Mass Spectrometry-Based Proteomics. In: *Current Protocols in Protein Science*. 2010. p. 55–71.
  103. Jagtap P, Goslinga J, Kooren JA, MCGowan T, Wroblewski MS, Seymour SL, et al. A two-step database search method improves sensitivity in peptide sequence matches for metaproteomics and proteogenomics studies. *Proteomics*. 2013;13(8):1352–7.
  104. Heyer R, Schallert K, Zoun R, Becher B, Saake G, Benndorf D. Challenges and perspectives of metaproteomic data analysis. *Journal of Biotechnology*. 2017;261(February):24–36.
  105. Välikangas T, Suomi T, Elo LL. A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteome quantification and imputation. *Briefings in Bioinformatics*. 2017;(March):1–12.
  106. Al Shweiki MHDR, Mönchgesang S, Majovsky P, Thieme D, Trutschel D, Hoehenwarter W. Assessment of Label-Free Quantification in Discovery Proteomics and Impact of Technological Factors and Natural Variability of Protein Abundance. *Journal of Proteome Research*. 2017;16(4):1410–24.
  107. Blank C, Easterly C, Gruening B, Johnson J, Kolmeder C, Kumar P, et al. Disseminating Metaproteomic Informatics Capabilities and Knowledge Using the Galaxy-P Framework. *Proteomes*. 2018;6(1):7.

108. The Uniprot Consortium. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*. 2014;42(D1):191–8.
109. Mesuere B, Van der Jeugt F, Devreese B, Vandamme P, Dawyndt P. The unique peptidome: taxon-specific tryptic peptides as biomarkers for targeted metaproteomics.;[www.proteomics-journal.com](http://www.proteomics-journal.com) Page 1 *Proteomics*. 2015;1–29.
110. Federhen S. The NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(D1):D1086–98.
111. Mesuere B, Debyser G, Aerts M, Devreese B, Vandamme P, Dawyndt P. The Unipept metaproteomics analysis pipeline. *Proteomics*. 2015;15(8):1437–42.
112. Mesuere B, Van der Jeugt F, Willems T, Naessens T, Devreese B, Martens L, et al. High-throughput metaproteomics data analysis with Unipept: A tutorial. *Journal of Proteomics*. 2018;171:11–22.
113. Mesuere B, Willems T, Van Der Jeugt F, Devreese B, Vandamme P, Dawyndt P. Unipept web services for metaproteomics analysis. *Bioinformatics*. 2016;32(11):1746–8.
114. Bouladoux N, Harrison OJ, Belkaid Y. The mouse model of infection with *Citrobacter rodentium*. *Current Protocols in Immunology*. 2017;2017(November):19.15.1-19.15.25.
115. Cox J, Mann M. Computational Principles of Determining and Improving Mass Precision and Accuracy for Proteome Measurements in an Orbitrap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009;20(8):1477–85.
116. Schaab C, Geiger T, Stoehr G, Cox J, Mann M. Analysis of High Accuracy, Quantitative Proteomics Data in the MaxQB Database. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(3):M111.014068.
117. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*. 2008;26(12):1367–72.
118. Cox J, Michalski A, Mann M. Software lock mass by two-dimensional minimization of peptide mass errors. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2011;22(8):1373–80.
119. Tyanova S, Temu T, Carlson A, Sinitcyn P, Mann M, Cox J. Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics*. 2015;15(8):1453–6.
120. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M. Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of Proteome Research*. 2011;10(4):1794–805.
121. Kleiner M, Thorson E, Sharp CE, Dong X, Liu D, Li C, et al. Assessing species biomass contributions in microbial communities via metaproteomics. *Nature Communications*. 2017;8(1).

122. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*. 2016;13(9):731–40.
123. Cox J, Mann M. 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC bioinformatics*. 2012;13 Suppl 1(Suppl 16):S12.
124. The Gene Ontology Consortium (Carbon S, Dietze H, Lewis SE, Mungall CJ, Munoz-Torres MC, Basu S, et al). Expansion of the gene ontology knowledgebase and resources: The gene ontology consortium. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D331–8.
125. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the panther classification system. *Nature Protocols*. 2013;8(8):1551–66.
126. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D183–9.
127. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):377–86.
128. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research*. 2003;13(9):2129–41.
129. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(1):1–13.
130. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 2009;4(1):44–57.
131. Fanglian H. Laemmli SDS PAGE. *Bio-Protocol*. 2011;1(11):4–7.
132. Petty NK, Toribio AL, Goulding D, Foulds I, Thomson N, Dougan G, et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A generalized transducing phage for the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. 2009;153(Pt 9):2984–8.
133. Yiakouvaki A, Dimitriou M, Karakasiliotis I, Eftychi C, Theocharis S, Kontoyiannis DL. Myeloid cell expression of the RNA-binding protein HuR protects mice from pathologic inflammation and colorectal carcinogenesis. *Group*. 2012;122(1).
134. Lopez CA, Miller BM, Rivera-chávez F, Velazquez EM, Byndloss MX, Chávez-arroyo A, et al. Virulence factors enhance *Citrobacter rodentium* expansion through aerobic respiration. *Science*. 2016;353(6305):1249–53.
135. Ahmed I, Roy B, Chandrakesan P, Venugopal A, Xia L, Jensen R, et al.

- Evidence of functional cross talk between the Notch and NF- $\kappa$ B pathways in nonneoplastic hyperproliferating colonic epithelium. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2013;304(4):G356–70.
136. Jones RD, Taylor AM, Tong EY, Repa JJ. Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse. *Drug Metabolism and Disposition*. 2013;41(1):40–9.
  137. Lian J, Nelson R, Lehner R. Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein & Cell*. 2018;9(2):178–95.
  138. Xu J, Li Y, Chen WD, Xu Y, Yin L, Ge X, et al. Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. *Hepatology*. 2014;59(5):1761–71.
  139. Khan M a, Ma C, Knodler L a, Rosenberger CM, Deng W, Brett B, et al. Toll-Like Receptor 4 Contributes to Colitis Development but Not to Host Defense during *Citrobacter rodentium* Infection in Mice Toll-Like Receptor 4 Contributes to Colitis Development but Not to Host Defense during *Citrobacter rodentium* Infection in Mice. *Infection and immunity*. 2006;74(5):2522–36.
  140. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters*. 2015;588(22):4223–33.
  141. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*. 2015;8(1):1–16.
  142. Tanca A, Palomba A, Fraumene C, Pagnozzi D, Manghina V, Deligios M, et al. The impact of sequence database choice on metaproteomic results in gut microbiota studies. *Microbiome*. 2016;4:1–13.
  143. Wallenius K, Niemi RM, Rita H. Using stratified sampling based on pre-characterisation of samples in soil microbiological studies. *Applied Soil Ecology*. 2011;51(1):111–3.
  144. Prosser JI. Replicate or lie. *Environmental Microbiology*. 2010;12(7):1806–10.
  145. Oberg AL, Vitek O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(5):2144–56.
  146. J Breen E. Sample Replication Effects on Statistical Power in Multiplexed Immunoassay Analysis. *MOJ Proteomics & Bioinformatics*. 2016;4(3):4–6.