



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

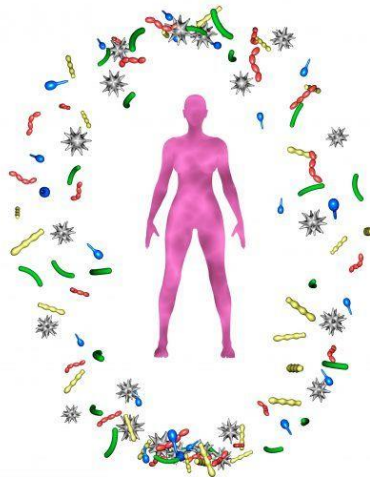
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Μεταγονιδιωματική ανάλυση σε ιστούς ασθενών με μεταστατικό καρκίνο»



Κώτσιρα Βασιλική

Πτυχιούχος Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής

ΑΘΗΝΑ 2020



HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens
— EST. 1837 —

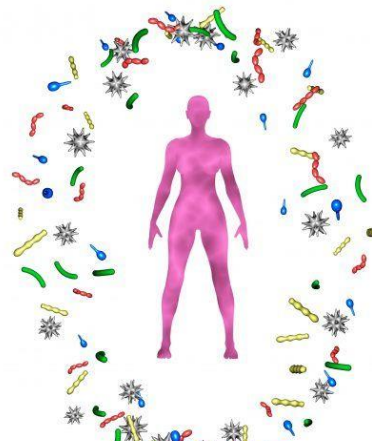
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MASTER IN «BIOINFORMATICS»

Master Diploma Thesis

**«Metagenomic analysis of tissues from
patients with metastatic cancer»**



Vasiliki Kotsira

Medical Laboratory Technologist, University of West Attica

A T H E N S 2 0 2 0



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

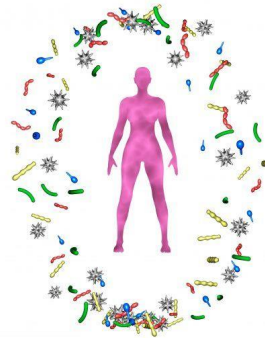
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Μεταγονιδιωματική ανάλυση σε ιστούς ασθενών με μεταστατικό
καρκίνο»



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Καθηγητής Παντελής Μπάγκος

*Τομέας Βιοπληροφορικής και Βιοστατιστικής,
Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

Καθηγητής Ιωάννης Π. Τρουγκάκος

*Τομέας Βιολογίας, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
(ΕΚΠΑ)*

Αναπληρωτής Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας

*Τομέας Φυσικής,
Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Εθνικό
Μετσόβιο Πολυτεχνείο*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διερεύνηση του ρόλου του ανθρώπινου μικροβιώματος αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα αναπόσπαστο κομμάτι της έρευνας στα πεδία της Βιολογίας και της Ιατρικής. Το μικροβιακό σύστημα που εντοπίζεται στον άνθρωπο, και ειδικά αυτό του πεπτικού σωλήνα, αποτελεί μεγάλο μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος και την σύνδεση αυτού με αρκετά ανθρώπινα όργανα. Το μικροβίωμα ενεργεί συνεργατικά με το ανθρώπινο σύστημα, επιτυγχάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο ισορροπία, καθώς οι μικροοργανισμοί βοηθούν στην παραγωγή απαραίτητων, για εκείνο, θρεπτικών συστατικών και όχι μόνο. Σε περιπτώσεις διατάραξης αυτής της ισορροπίας, έρευνες έχουν δείξει πως οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να προκαλέσουν ή να εμπλακούν σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του μικροβιώματος σε ιστούς ασθενών με μεταστατικό καρκίνο, χρησιμοποιώντας δεδομένα από πειράματα RNA-Seq. Η διαφοροποιημένη έκφραση μικροοργανισμών στις διαφορετικές καταστάσεις (adjacent tissue, primary tumor tissue, metastatic tissue) υπονοούν την πιθανή συσχέτισή τους με λειτουργίες της ασθένειας του καρκίνου. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη βάση δεδομένων NCBI GEO. Οι αλγόριθμοι στους οποίους στηρίχθηκε το μεγαλύτερο μέρος της ανάλυσης ήταν οι HISAT2 και AGAMEMNON.

Η εκτέλεση τους επέτρεψε τον εντοπισμό μικροβιακών αλληλουχιών αρκετές από τις οποίες έχουν συσχετιστεί, στη βιβλιογραφία, με τη δημιουργία τοξικού περιβάλλοντος το οποίο ευνοεί τη δημιουργία φλεγμονής και κατά συνέπεια την ογκογένεση. Η μετάσταση του καρκίνου αποτελεί μια διαδικασία αυξημένης πολυπλοκότητας, ενώ η βιβλιογραφία που αναφέρεται στις συσχετίσεις μικροοργανισμών με αυτήν είναι περιορισμένη. Αρκετοί μικροοργανισμοί που έχει δειχθεί πως κατέχουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στον καρκίνο, βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη να είναι μειωμένοι ή και απόντες στις καρκινικές καταστάσεις.

ABSTRACT

In recent years, the research on the role of the human microbiome consists an essential part of investigation in the fields of Biology and Medicine. The microbial system that can be found in humans, and especially that of the digestive tract, makes up a notable part of the immune system and its connections to other human organs. The microbiome acts synergistically with the human system to achieve balance, since microorganisms assist in the production of necessary nutrients and more. In cases where this balance fails to be achieved, studies have found that microorganisms can cause or be involved in several diseases, including cancer.

The aim of this thesis is to investigate the microbiome in tissues from patients with metastatic cancer, using data from RNA-seq experiments. The differential abundance of microorganisms in different tissue states (adjacent tissue, primary tumor tissue, metastatic tissue) imply their possible association in pathways related to cancer. The data used were retrieved from NCBI GEO database. The algorithms used to carry out the metagenome analysis included HISAT2 and AGAMEMNON. Most of the metagenomic analysis was performed by employing HISAT2 and AGAMEMNON.

Their execution allowed the detection of microbial sequences several of which have been associated, in related literature, with the creation of toxic environments that favor inflammation and, therefore, cancer. Cancer metastasis is a process of increased complexity, while the literature on the association of microorganisms with it is currently limited. Several microorganisms that have been observed to possess a protective role against cancer have been found in this study to be downregulated or absent in cancerous conditions.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Παντελή Μπάγκο, καθώς και τον καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο και τον αναπληρωτή καθηγητή Αλέξανδρο Γεωργακίλα για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή της εξέτασης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέφεραν κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, χάρη στις οποίες κατάφερα να φέρω εις πέρας την παρούσα μελέτη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Άρτεμις Χατζηγεωργίου που μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με το εργαστήριο της, το DIANA-Lab. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Σκούφο για την πολύτιμη συμβολή του και καθοδήγηση που μου προσέφερε, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια και την υποστήριξη που μου έδωσαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Μικροοργανισμοί.....	7
1.2 Ανθρώπινο Μικροβίωμα	8
1.2.1 Ορισμός.....	8
1.2.2 Διαμόρφωση και λειτουργίες μικροβιώματος	10
1.2.3 Συσχετίσεις μικροβιώματος με ασθένειες	13
1.2.4 Καρκίνος και μικροβίωμα	15
1.2.5 Μετάσταση και μικροβίωμα	19
1.3 Τεχνολογία Αλληλούχισης Νέας Γενιάς – Next Generation Sequencing (NGS) - Μεταγονιδιωματική.....	20
1.4 Human Microbiome Project (HMP).....	22
1.5 Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	23
2. Μέθοδοι	24
2.1 Αναζήτηση και επιλογή δειγμάτων.....	24
2.2 Ανάκτηση δειγμάτων	24
2.3 Κατέβασμα των δειγμάτων και έλεγχος ποιότητας-προ-επεξεργασία αλληλουχιών	24
2.4 Στοιχισμός αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα.....	28
2.5 Στοιχισμός μη στοιχισμένων αλληλουχιών με χρήση εργαλείων μεταγονιδιωματικής για ταυτοποίηση	29
3. Αποτελέσματα.....	31
4. Συμπεράσματα	38
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	50
ΣΥΝΓΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΑ.....	50
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	53

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1 Αριθμός βακτηρίων ανά όργανο του ανθρώπινου σώματος.....	9
Πίνακας 2. Μεταδεδομένα του συνόλου των δειγμάτων της ανάλυσης.....	25
Πίνακας 3. Σύνολο reads ανά βήμα εκτέλεσης.....	31
Πίνακας 4. Αποτελέσματα του metagenomeSeq για το dataset 1.....	34
Πίνακας 5. Αποτελέσματα του metagenomeSeq για το dataset 2.....	38
Πίνακας 6. Αποτελέσματα edgeR για το dataset 3.....	40
Πίνακας 7. Αποτελέσματα του edgeR μετά την ένωση των δειγμάτων.....	41

1. Εισαγωγή

1.1 Μικροοργανισμοί

Μικροοργανισμοί ονομάζονται όλοι οι ζώντες οργανισμοί, συνήθως μονοκύτταροι που δεν μπορούν να διακριθούν με γυμνό μάτι, καθώς έχουν μέγεθος μικρότερο από 0,1 mm. Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού γύρω μας, στο έδαφος, σε ποτάμια, ωκεανούς, φυτά, ζώα και στο ανθρώπινο σώμα. Ο όρος μικροοργανισμός αναφέρεται σε ένα εύρος οργανισμών που περιέχει: βακτήρια, αρχαία, πρωτόζωα, μύκητες και ιούς. Ανάλογα με το αν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα διακρίνονται σε προκαρυωτικούς ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς. [1]

Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί. Ορισμένα βακτήρια χρειάζονται οξυγόνο για την επιβίωσή τους (υποχρεωτικά αερόβια), όπως το γένος *Mycobacterium*, άλλα αναπτύσσονται με ταχύτερο ρυθμό παρουσία οξυγόνου (προαιρετικά αερόβια) και άλλα επιβιώνουν μόνο απουσία οξυγόνου (υποχρεωτικά αναερόβια), όπως το γένος *Clostridium*.

Όσον αφορά την μορφολογία των βακτηρίων, μπορεί να έχουν σχήμα σφαιρικό (κόκκοι), ραβδοειδές (βάκιλοι), σπειροειδές (σπειρίλια) ή καμπυλόγραμμες ράβδους (δονάκια). Το γενετικό τους υλικό (DNA) βρίσκεται κατά κανόνα σε συγκεκριμένη περιοχή που ονομάζεται πυρηνοειδές. Τα βακτήρια διαθέτουν επίσης πλασμίδια, τα οποία είναι μικρότερα αυτόνομα κυκλικά μόρια γενετικού υλικού. Τα πλασμίδια έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο προσδίδοντας έτσι καινούργιες ιδιότητες. Η πλασματική τους μεμβράνη περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα, που είναι διαφορετικό σε σύσταση ανάλογα το βακτήριο και απαραίτητο για την σταθερότητα και την διαίρεση του. Τα βακτήρια κατατάσσονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα Gram (+) και τα Gram (-). Ο διαχωρισμός αυτός πραγματοποιείται με τη χρώση κατά Gram, όπου παρουσία πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου έχουμε παρουσία μπλε-ιώδους χρώματος (Gram (+)), ενώ απουσία πεπτιδογλυκάνης έχουμε παρουσία κόκκινου χρώματος και πρόκειται για Gram(-) βακτήρια. Ορισμένα βακτήρια διαθέτουν και ένα επιπλέον περίβλημα, την κάψα.

Αρχαία

Τα Αρχαία είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί. Μπορεί να φαίνονται παρόμοια με τα βακτήρια, όμως διαθέτουν σημαντικές διαφορές. Μέχρι τη δεκαετία του 1970, αυτή η ομάδα μικροβίων ταξινομούνταν ως βακτήρια. Η πλασματική τους μεμβράνη αποτελείται από μοναδικά λιπίδια που δε βρίσκονται σε άλλους οργανισμούς, ενώ ορισμένα διαθέτουν και κυτταρικό τοίχωμα χωρίς

παρουσία πεπτιδογλυκάνης. Τα αρχαία ζουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως είναι η θερμοκρασία άνω των 100°C, σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον. Η ταξινόμηση τους είναι δύσκολη καθώς δεν έχουν απομονωθεί εργαστηριακά αλλά έχουν εντοπιστεί, μέσω της ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων, σε δείγματα του περιβάλλοντος. [2][3]

Μύκητες

Οι μύκητες αποτελούν ένα από τα 5 βασίλεια των έμβιων όντων και διακρίνονται σε μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι περισσότεροι μύκητες βρίσκονται στο έδαφος και στα φυτά και θεωρούνται ως «βιολογικό εργαστήριο αποδόμησης οργανικών ουσιών», καθώς διατρέφονται από οργανικά συστατικά ζώντων ή νεκρών οργανισμών.

Σχετικά με τη δομή των μυκήτων, διακρίνονται σε μονοκύτταρους (οπότε χαρακτηρίζονται ως ζύμες) ή κοινοκυτταρικούς οργανισμούς (δηλαδή διαθέτουν κυτταρόπλασμα με πολυάριθμους πυρήνες). Στην τελευταία περίπτωση, αυτοί αποτελούνται συνήθως από απλούστερες νηματοειδείς δομές, τις υφές (όπως η κοινή μούχλα). Το δίκτυο που σχηματίζουν οι υφές ονομάζεται μυκήλιο και μπορεί είτε να εισχωρεί στο θρεπτικό υπόστρωμα είτε να είναι εναέριο. Επειδή δεν έχουν εσωτερικό σύστημα πέψης, εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα στο θρεπτικό μέσο και τα προϊόντα της πέψης απορροφώνται από τα κύτταρα του μύκητα με σχηματισμούς σα ριζίδια (ριζοειδή).

Ιοί

Οι ιοί χαρακτηρίζονται ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 20-300 nm. Δεν αποτελούνται από κύτταρα και κατά συνέπεια δεν μπορούμε να τους θεωρήσουμε οργανισμούς. Χρησιμοποιούν κυτταρικούς μηχανισμούς του ξενιστή για την αντιγραφή τους. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους είναι το μέγεθος τους, το είδος του γενετικού τους υλικού και οι μεταβολικές τους ικανότητες.

Μπορεί να περιέχουν είτε DNA είτε RNA ως γενετικό υλικό, το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, το καψίδιο. Ορισμένοι ιοί διαθέτουν και ένα επιπλέον περίβλημα, το έλυτρο, το οποίο είναι λιποπρωτεϊνικής φύσης.

1.2 Ανθρώπινο Μικροβίωμα

1.2.1 Ορισμός

Ως ανθρώπινο μικροβίωμα ορίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν τα διάφορα σημεία του ανθρώπινου σώματος, με το μεγαλύτερο μέρος αυτού να βρίσκεται στο παχύ έντερο (**Πίνακας 1**). Το μικροβίωμα, ανάλογα

με τα σημεία αποικισμού, μπορεί να αποτελείται από βακτήρια, ιούς, αρχαία ή μύκητες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ζουν συμβιωτικά με τον άνθρωπο και υπολογίζεται ότι υπάρχουν περισσότερα από 1000 είδη βακτηρίων, με το 92% να αποτελείται από τα φύλα *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Παρότι υπάρχουν περισσότερα από 1000 είδη βακτηρίων, ένα άτομο φέρει πάνω από 10.000 διαφορετικά είδη, γεγονός που αποδεικνύει ότι η σύνθεση του μικροβιώματος είναι διαφορετική σε κάθε άνθρωπο. Δεδομένου ότι κάθε είδος μπορεί να φέρει έως και 2.000 διαφορετικά γονίδια, το σύνολο αυτών μπορεί να φτάσει τα 2.000.000, αριθμός που ξεπερνάει κατά 100 φορές τα ανθρώπινα γονίδια. Σε δημοσίευση του 1972 υποστήριζαν πως η αναλογία βακτηριακού και ανθρώπινου κυττάρου είναι 10:1, κάτι τέτοιο όμως έχει καταρριφθεί από πρόσφατες μελέτες, καταλήγοντας πως η αναλογία είναι περίπου 1,3:1. Οι μελέτες αυτές όμως μιλούν για κύτταρα βακτηρίων, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη άλλα είδη μικροοργανισμών. [4][5][6]

Πίνακας 1 Αριθμός βακτηρίων ανά όργανο του ανθρώπινου σώματος

Θέση	Τυπική συγκέντρωση βακτηρίων (αριθμός/ mL)	Όγκος (mL)	Ανώτατη τάξη μεγέθους του αριθμού των βακτηρίων
Παχύ έντερο	10^{11}	400	10^{14}
Οδοντική πλάκα	10^{11}	<10	10^{12}
Κάτω λεπτό έντερο	10^8	400	10^{11}
Σάλιο	10^9	<100	10^{11}
Δέρμα	$<10^{11}$ per m ²	1.8 m ²	10^{11}
Στομάχι	$10^3 - 10^4$	250 – 900	10^7
Άνω λεπτό έντερο	$10^3 - 10^4$	400	10^7

Ο όρος μικροβίωμα προτάθηκε το 2001 από τον νομπελίστα Αμερικάνο μοριακό βιολόγο Joshua Lederberg. Η άποψή του στήριζε πως τα βακτήρια που απαρτίζουν το ανθρώπινο σώμα έχουν προστατευτικούς ρόλους και πως μαζί με τον άνθρωπο δημιουργούν μια μεταβολική μονάδα.

Η πρώτη παρατήρηση μικροοργανισμών σε ιστό, παρόλα αυτά, είχε λάβει χώρα το 1683 από τον Ολλανδό επιστήμονα Anton van Leeuwenhoek, όπου εντόπισε στο μικροσκόπιο του κάποιου είδους μικροσκοπικούς οργανισμούς στην γαστρεντερική οδό, αγνοώντας φυσικά ότι έκανε την πρώτη περιγραφή βακτηρίου. Δύο αιώνες αργότερα, ο Γάλλος χημικός Louis Pasteur επιβεβαίωσε την ύπαρξη αναερόβιων εντερικών βακτηρίων. Το 1908 ο Ilya Mechnikov,

καθηγητής του ινστιτούτου Pasteur στη Γαλλία, περιέγραψε πως τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) μπορούν να συμβάλλουν στην ανθρώπινη υγεία και μακροζωία. Έτσι, πρότεινε πως αλλαγές στη φυσιολογική εντερική χλωρίδα θα μπορούσαν να καταστείλουν τη γήρανση μέσω αντικατάστασης του *Clostridium*, που παράγει τοξικές ουσίες, με *Lactobacillus*. [7]

1.2.2 Διαμόρφωση και λειτουργίες μικροβιώματος

Ο χαρακτηρισμός του ανθρώπινου μικροβιώματος αποτελεί σημαντικό βήμα για την κατανόηση τόσο των λειτουργιών του σε υγιείς καταστάσεις, όσο και σε παθολογικές. Η ανάγκη αυτή έδωσε το έναυσμα στην έναρξη δύο μεγάλων μελετών, το MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract), χρηματοδοτούμενο από την Ευρωπαϊκή Ένωση, καθώς και το Human Microbiome Project, χρηματοδοτούμενο από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής. [5]

Διαμόρφωση

Η διαμόρφωση του μικροβιώματος στο έντερο αρχίζει ήδη κατά την διάρκεια της κύησης, όπως αποδεικνύεται από την ύπαρξη μικροοργανισμών στο αμνιακό υγρό και το ομφάλιο λώρο. Μελέτες έχουν δείξει πως οι πρώτοι αποικιστές μετά τη γέννα επηρεάζονται από τον τρόπο τοκετού του βρέφους, αλλά και από το περιβάλλον που βρίσκονται τις πρώτες ώρες. Για παράδειγμα, αν ένα βρέφος γεννηθεί με φυσιολογικό τοκετό, η φυσιολογική του μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από τα είδη *Lactobacillus* sp. και *Bifidobacterium* sp., τα οποία βρίσκονται στον κόλπο της μητέρας. Αντιθέτως, αν ένα βρέφος γεννηθεί με καισαρική, η φυσιολογική μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από μικρόβια του δέρματος, όπως είναι ο *Staphylococcus*. Η απόκτηση νέων μικροβίων συνεχίζεται τα πρώτα χρόνια ζωής και η εντερική μικροχλωρίδα του βρέφους αρχίζει να μοιάζει με αυτή ενός ενήλικα ήδη από το 1ο έτος της ζωής του (**Εικόνα 1**). [5][8][9]

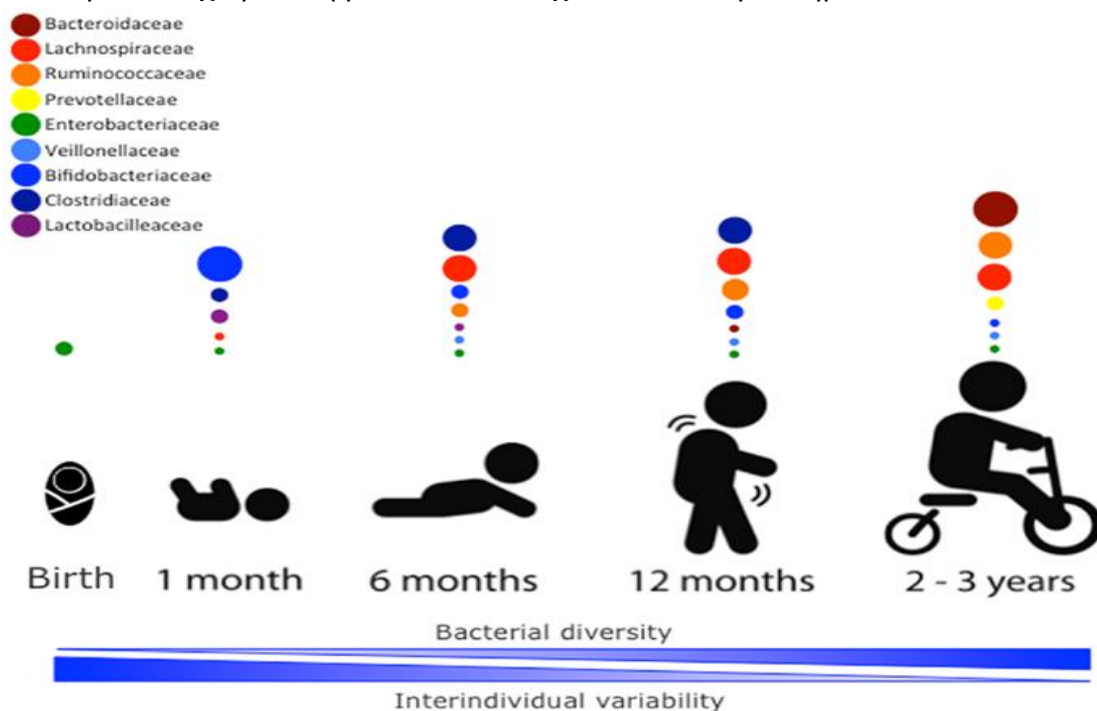
Λειτουργίες

Οι βασικές κατηγορίες λειτουργιών που συμμετέχουν οι μικροοργανισμοί της φυσιολογικής μικροχλωρίδας είναι ο μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών, η προστασία από την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών, η απόκριση στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και η συμμετοχή τους στη διαμόρφωση διαφόρων παθολογικών και υγιών καταστάσεων. [5][11]

Μεταβολισμός

Το μικροβίωμα του εντέρου αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της πέψης και της διατροφής του ανθρώπου μέσω της διάσπασης μη εύπεπτων συστατικών. Ένα παράδειγμα αποτελεί η διάσπαση ολιγοσακχαριτών που βρίσκονται στα

κυτταρικά τοιχώματα φρούτων και λαχανικών. Τα βακτήρια αυτά αποτελούν



Εικόνα 1. Σχηματισμός του ανθρώπινου μικροβιώματος κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής [10]

μέλη του φύλου *Bacteroidetes*. Σε έρευνα ανάλυσης του ανθρώπινου μικροβιώματος παρατήρησαν πως το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθρώπων φέρουν τουλάχιστον ένα είδος του φύλου *Bacteroidetes*, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο την αλληλεξάρτηση ξενιστή-μικροβιώματος. [5]

Σημαντική λειτουργία αποτελεί η δημιουργία λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFA) από εντερικά βακτήρια, όπως τα είδη του *Clostridium* και του *Bifidobacterium*, κατά την διάσπαση σύνθετων υδατανθράκων όπως το βουτυρικό και προπανικό οξύ, που είναι πλούσιες πηγές ενέργειας για τον ξενιστή [12][13]. Το προπανικό οξύ έχει την δυνατότητα να αναστέλλει ορισμένες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, καθώς και να προκαλέσει απόπτωση καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Ακόμα, το μεγαλύτερο μέρος του προπανικού οξέος μεταβολίζεται στο ήπαρ και παίζει ρόλο στη μείωση των επιπέδων χοληστερίνης και γλυκόζης στον ορό του αίματος.

Επιπροσθέτως, το μικροβίωμα του εντέρου εμπλέκεται και στον έλεγχο του σωματικού βάρους μέσω της ρύθμισης της αποθήκευσης του σωματικού λίπους, αλλά και της λιπογένεσης και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, η συνεχής πρόσληψη μη απορροφήσιμων υδατανθράκων αλλά και η μείωση του φύλου *Bacteroidetes* και η αύξηση του φύλου *Firmicutes* παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και στη διατήρηση της παχυσαρκίας. [7]

Βιταμίνες

Το μικροβίωμα του εντέρου έχει τη δυνατότητα σύνθεσης υδατοδιαλυτών βιταμινών. Η απορρόφηση αυτών γίνεται από το βλεννογόνο του παχέος εντέρου, σε αντίθεση με τις προσλαμβανόμενες βιταμίνες από την τροφή, όπου απορροφώνται στο τμήμα του λεπτού εντέρου.

Άλλη μια σημαντική μεταβολική λειτουργία του μικροβιώματος του παχέος εντέρου είναι η ικανότητα μετατροπής της βιταμίνης K1, η οποία προσλαμβάνεται μέσω της τροφής, σε K2, στη σύνθεση των περισσοτέρων από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες B και του φυλλικού οξέος. [14][15]

Η βιταμίνη B1 αποτελεί έναν σημαντικό συμπράγοντα για τον σχηματισμό τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και μεταβολισμού ενέργειας. Η έλλειψη της βιταμίνης B1 μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες, κακή παροχή ενέργειας από μιτοχόνδρια καθώς και σε νευρικές βλάβες. Μελέτες έχουν δείξει πως η αύξηση της βιταμίνης B1 αποτελεί αποτέλεσμα των μικροοργανισμών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus helveticus*.

Κύριες λειτουργίες της βιταμίνης B2 αποτελούν η αντιοξειδωτική δράση καθώς και η δράση της ως συμπράγοντας σε διάφορα ένζυμα. Σε περιπτώσεις ανεπάρκειας παρουσιάζονται εκφυλίσεις του νευρικού ιστού, καθώς και ενδοκρινικές δυσλειτουργίες. Παρότι η βιταμίνη B2 συντίθεται από το μικροβίωμα, δεν έχουν βρεθεί ακόμα συγκεκριμένα στελέχη που επιτελούν τη συγκεκριμένη διαδικασία. [14]

Ανοσοποιητικό σύστημα

Το μικροβίωμα του εντέρου έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαμόρφωση του μικροβιώματος ξεκινάει κατά την κύηση, και ιδιαίτερα τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση. Αυτός είναι ένας ζωτικός αμυντικός μηχανισμός που μαθαίνει στον ανθρώπινο οργανισμό πώς να ανταποκρίνεται στα μικρόβια μετά την είσοδο τους σε αυτόν. Πειράματα σε Germ-free (GF) ζώα έχουν δείξει πως η έλλειψη εντερικού μικροβιώματος προκαλεί σημαντική ανεπάρκεια στο ανοσοποιητικό σύστημα. Το μικροβίωμα του εντέρου, σε συνδυασμό με τον βλεννογόνο, δημιουργούν ένα φράγμα προστασίας για το έντερο. Σε περιπτώσεις μεταβολής της σταθερότητας αυτής έχουμε την λεγόμενη δυσβίωση, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής και κατά συνέπεια τη δημιουργία διαφόρων ασθενειών. [16][17]

Το εντερικό μικροβίωμα μπορεί να τροποποιήσει τις περιβαλλοντικές συνθήκες εντός του ξενιστή μέσω της παραγωγής συγκεκριμένων μεταβολιτών και έτσι να εμποδίσει την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό παθογόνων

μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, το βουτυρικό, ένα λιπαρό οξύ βραχείας αλυσίδας (SCFA) που παράγεται από το εντερικό σύστημα, μπορεί να ρυθμίσει προς τα κάτω την έκφραση αρκετών γονιδίων πολλαπλασιασμού της *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* (*S. Enteritidis*) και *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) και έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη της εντεροαιμορραγικής *Escherichia coli* (EHEC). Ορισμένα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* μπορούν επίσης να προστατεύσουν από την μόλυνση με EHEC μέσω της παραγωγής οξικού οξέος. Το εντερικό μικροβίωμα είναι επίσης ικανό να παράγει έναν μεγάλο αριθμό βιοενεργών μικρών μορίων, τα οποία δρουν προς άλλα μέλη του εντερικού μικροβιώματος ή/και προς εντερικά παθογόνα. Οι βακτηριοκίνες, για παράδειγμα, είναι αντιμικροβιακά πεπτίδια που μπορούν να θανατώσουν επιλεκτικά ή να αναστείλουν την ανάπτυξη ανταγωνιστικών βακτηρίων. [17]-[19]

1.2.3 Συσχετίσεις μικροβιώματος με ασθένειες

Το σώμα μας εκτίθεται συνεχώς τόσο σε παροδικά μικρόβια όσο και στα μικρόβια που απαρτίζουν την φυσιολογική χλωρίδα, αλλά και στα παραγόμενα προϊόντα τους, συμπεριλαμβανομένων και των τοξικών μεταβολιτών. Η μεταβολή της φυσιολογικής χλωρίδας στον άνθρωπο έχει σαν αποτέλεσμα τη μη ισορροπημένη λειτουργία των συμβιωτικών μικροοργανισμών και κατά επέκταση την δημιουργία ασθενειών. Στο γαστρεντερικό σύστημα οι διαταραχές αυτές σχετίζονται με νευρολογικές, αναπνευστικές, μεταβολικές, ηπατικές καθώς και καρδιαγγειακές ασθένειες. [20]

Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση του πεπτικού σωλήνα με περιοδική ανάγκη για φαρμακευτική αγωγή ή ακόμη και χειρουργική επέμβαση, με μεγαλύτερη ανάπτυξη σε χώρες της Αμερικής και της Ευρώπης. Κύρια συμπτώματα αποτελούν το κοιλιακό άλγος, εμπύρετο, απώλεια βάρους, διαρροϊκές κενώσεις και αναιμία λόγω της πιθανής απώλειας αίματος κατά την κένωση. Οι δύο κύριες ασθένειες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι η ελκώδης κολίτιδα, με κυριότερα σημεία εντοπισμού τα κόλον και ορθό, και η νόσος Chron που μπορεί να εντοπιστεί σε διάφορα σημεία του λεπτού και του παχέος εντέρου. Η ακριβής αιτιολογία των δύο αυτών ασθενειών δεν είναι εντελώς ξεκάθαρη. Περιβαλλοντικές αιτίες, γενετικές προδιαθέσεις καθώς και αλλαγή στη φυσιολογική μικροχλωρίδα αναφέρονται ως πιθανά αίτια. Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την σύγκριση βακτηρίων του μικροβιώματος από ασθενή σε ασθενή σε σύγκριση με υγιείς. Παρότι οι ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου φαίνεται να εμφανίζουν παραλλαγές στο μικροβίωμα, έχει παρατηρηθεί μια μείωση των φύλων *Firmicutes* και *Bacteroidetes* και αύξηση του φύλου *Proteobacteria*. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί μείωση των *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus manihotivorans* και *Pediococcus*

acidilactici κατά την έξαρση της φλεγμονής. Ερευνητές προτείνουν πως η αξιολόγηση του μικροβιώματος του βλεννογόνου του εντέρου μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη διάγνωση των φλεγμονωδών νόσων. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει πως η χρήση προβιοτικών και πρεβιοτικών μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των επιπέδων φλεγμονής. [21]–[24]

Αυτισμός

Ο αυτισμός αποτελεί μια αναπτυξιακή διαταραχή, η οποία αποτελεί μέρος μιας ομάδας διαταραχών που ονομάζεται Διαταραχές Αυτιστικού Φάσματος (ASD). Εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία και διαρκεί για όλη τη ζωή του ατόμου. Η διαταραχή αυτή επηρεάζει τις γνωσιακές, κοινωνικές και επικοινωνιακές ικανότητες του. Τα περισσότερα παιδιά με αυτισμό παρουσιάζουν ακόμη συμπτώματα όπως διαρροϊκές κενώσεις, κοιλιακό φούσκωμα, δυσκοιλιότητα κ.α. Παρόλο που δεν αποτελεί ψυχιατρική νόσο, συγκαταλέγεται στην κατηγορία των Διάχυτων Αναπτυξιακών Διαταραχών. Στις ASD ανήκει το σύνδρομο Asperger και η διάχυτη αναπτυξιακή διαταραχή. Είναι γνωστό πως η αμφίδρομη σχέση πεπτικού σωλήνα και εγκεφάλου μέσω του μικροβιώματος είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση μιας υγιούς κατάστασης. Έτσι, πιστεύεται ότι τα βακτήρια είναι πιθανό να επικοινωνούν με το κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω νευρικών, ενδοκρινικών και ανοσολογικών οδών και να επηρεάζουν τη λειτουργία του εγκεφάλου. Έρευνες έχουν δείξει πως το μικροβίωμα του εντέρου σε παιδιά με αυτισμό είναι διαφορετικό από τα υγιή παιδιά, αλλά ακόμη και από τα άτομα που πάσχουν από ασθένειες του νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, τα γένη *Prevotella* και *Coprococcus* έδειξαν χαμηλότερα ποσοστά σε παιδιά με αυτισμό σε σύγκριση με τα υγιή. Ένα από τα σημαντικά ευρήματα ήταν ο εντοπισμός αναερόβιων και μικροαερόφιλων βακτηρίων που δεν σχηματίζουν σπόρια στο μικροβίωμα των παιδιών με αυτισμό, ενώ στα υγιή υπήρχε παντελής έλλειψη. [25][26] Μια άλλη μελέτη δείχνει πως τα παιδιά με ASD έχουν χαμηλότερο ποσοστό βακτηρίων που σχετίζονται με την πέψη πολυσακχαριτών, γεγονός που συμφωνεί με την δυσκολία που έχουν στην πέψη υδατανθράκων. [26] Ακόμη, έχει βρεθεί πως η συγκέντρωση των αντισωμάτων IgA είναι υψηλότερη σε άτομα με ASD, υποδηλώντας τη διαφορετική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος σε σχέση με τα υγιή. Δεδομένων όλων των ευρημάτων σε σχέση με τις αλλαγές στο μικροβίωμα των ασθενών ισχυροποιείται όλο και περισσότερο η ένδειξη ύπαρξης συσχετισμού μεταξύ αυτισμού και μικροβιώματος. [27]

Ασθένειες του ήπατος

Το ήπαρ αποτελεί το μεγαλύτερο στερεό όργανο του ανθρώπινου σώματος και βρίσκεται στο άνω δεξιό τμήμα της κοιλιακής κοιλότητας. Σημαντικές λειτουργίες των ηπατοκυττάρων είναι η δημιουργία χολής, η απορρόφηση και η παραγωγή θρεπτικών συστατικών καθώς και η απομάκρυνση βλαβερών ουσιών από το αίμα. Ανατομικά υπάρχει σύνδεση μέσω της πυλαίας φλέβας και του αλλήριου

τρίποδα μεταξύ ήπατος, σπλήνα και γαστρεντερικού σωλήνα. Με αυτόν τον τρόπο το έντερο και το ήπαρ έχουν άμεση αλληλεπίδραση απορροφώντας θρεπτικά ουσίες που δημιουργούνται στο ήπαρ. Ακόμα, η αιθανόλη, η αμμωνία και η ακεταλδεΰδη που παράγονται από το μικροβίωμα του εντέρου και μεταβολίζονται στο ήπαρ ελέγχουν τη δραστηριότητα των κυττάρων Kupffer (μακροφάγα ήπατος).

Το *Akkermansia muciniphila* αποτελεί ένα κατά Gram (-) αναερόβιο βακτήριο του μικροβιώματος του εντέρου, το οποίο σε καταστάσεις μειωμένης αφθονίας έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί βλάβη στο βλεννογόνο του εντέρου, ο οποίος σε φυσιολογικές συνθήκες λειτουργεί σαν φραγμός. Αποτέλεσμα έχει να δίνεται η δυνατότητα μετατόπισης μικροβίων μέσω του πυλαίου φλεβικού συστήματος, δημιουργώντας φλεγμονή και βλάβες στο ήπαρ. Ασθένειες του ήπατος όπως η μη αλκοολική λιπώδης νόσος, η αλκοολική λιπώδης νόσος και η κίρρωση έχουν μελετηθεί αρκετά σε επίπεδο εντερικού-ηπατικού μικροβιώματος. Χαρακτηριστικές αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο είναι η αυξημένη αφθονία των μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Bacteroides vulgatus* στο μικροβίωμα του εντέρου καθώς και η μείωση των *Firmucutes* και η αύξηση των προφλεγμονωδών μικροοργανισμών όπως τα *Proteobacteria* και *Enterobacteriaceae*. Η μη αλκοολική και η αλκοολική λιπώδης νόσος αποτελεί συνέπεια πολλών παραγόντων, πέραν του μικροβιώματος, όπως είναι το ανοσοποιητικό σύστημα και γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Σε μελέτες για την αλκοολική λιπώδη νόσο, έχει παρατηρηθεί μειωμένη αφθονία των *Bacteroidetes* and *Lactobacillus* και αύξηση της οικογένειας *Enterobacteriaceae* στο μικροβίωμα του εντέρου. Ενδιαφέρον αποτελεί και η αύξηση του γένους *Candida*. Παρόλα αυτά, η εξισορρόπηση αυτής της δυσβίωσης του μικροβιώματος του εντέρου με χρήση προβιοτικών έχει δείξει θετικά αποτελέσματα. Μελλοντικός στόχος αποτελεί η χρήση μικροβίων ως βιοδείκτες για την διάγνωση αυτών των ασθενειών σε πρώιμο στάδιο. [24], [28]–[31]

1.2.4 Καρκίνος και μικροβίωμα

Η διαταραχή της ομοιόστασης του μικροβιώματος δεν σχετίζεται μόνο με τις προαναφερόμενες παθολογικές καταστάσεις. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει σχέση μεταξύ μικροβιώματος και καρκίνου, αλλά και μεταξύ μόλυνσης από μικροοργανισμούς και καρκίνου. Εκμεταλλευόμενοι μια πιθανή βλάβη επιφανειακού φραγμού, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διεισδύσουν στον ιστό προκαλώντας τοπική χρόνια φλεγμονή και τοξικό περιβάλλον για το DNA του ξενιστή και εν τέλει πιθανή ογκογένεση. [32] Παράδειγμα μεταβολιτών των μικροοργανισμών το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει προφλεγμονώδεις μεσολαβητές όπως κυτοκίνες και ιντερλευκίνες, αποτελούν τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, όπως είναι το βουτυρικό, προκαλώντας έτσι δυσλειτουργία στον επιθηλιακό φραγμό. Γνωστή είναι πλέον και η σχέση μεταξύ καρκίνου και

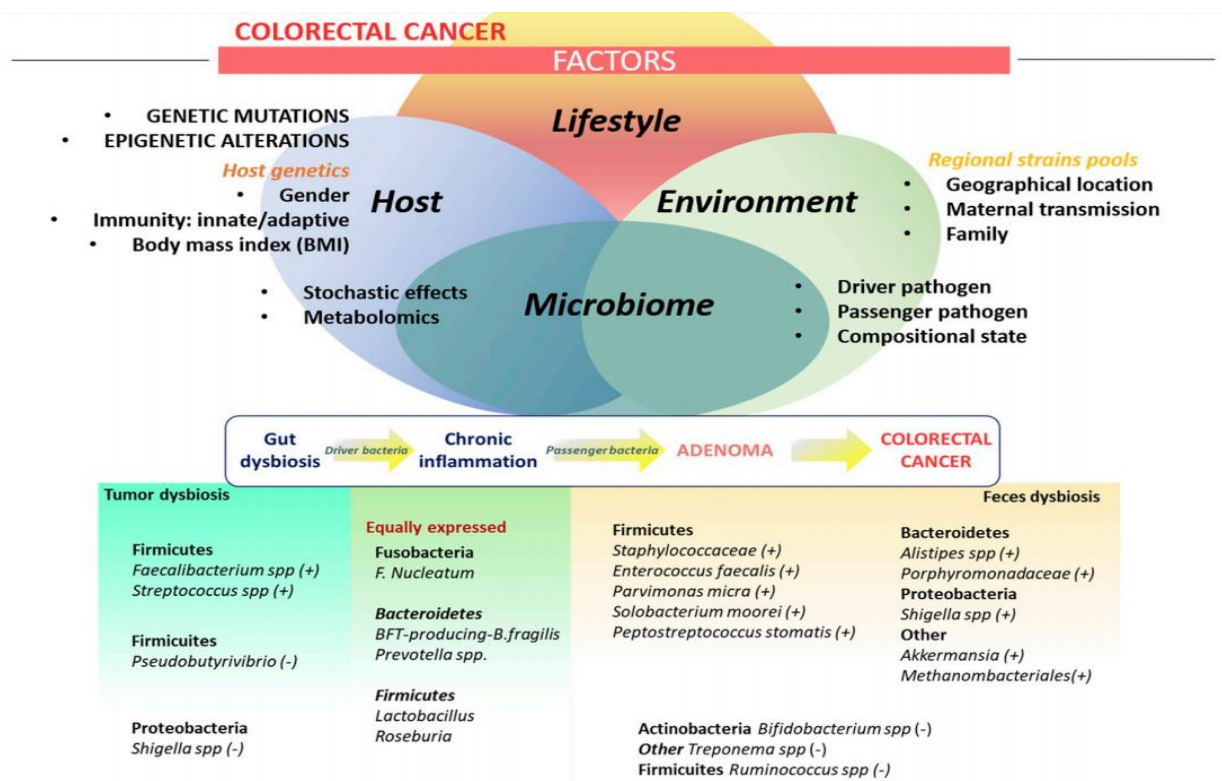
μικροβιώματος μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς γνωρίζουμε ότι τα μικρόβια κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, την εκπαίδευση και τη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή. Εξαιτίας όμως της μεταβλητότητας των μικροβιακών πληθυσμών, ανάλογα με το σημείο του σώματος που απαρτίζουν, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση καρκίνου διαφέρουν. [34][35]

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), το οποίο προκαλεί έλκος στο στομάχι. Η μακροχρόνια μόλυνση με το βακτήριο αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλλοίωση του βλεννογόνου του στομάχου και κατ' επέκταση την αυξημένη πιθανότητα για εμφάνιση καρκίνου. [36][37] Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το ελικοβακτηρίδιο μπορεί να προκαλέσει καρκίνο αποδίδεται στην παρουσία του γονιδίου CagA και στην έκκριση παραγόντων όπως VacA, ουρεάση και NapA2 για την προώθηση χρόνιας φλεγμονής. [33] Μερικά ακόμη παραδείγματα συσχέτισης μικροβίων και καρκίνου αποτελούν η μόλυνση με συγκεκριμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), η χρόνια μόλυνση από τους ιούς της ηπατίτιδας Β και C και ο ιός HIV που προκαλεί το AIDS, καθώς καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα ο οργανισμός να γίνεται πιο επιρρεπής στην εμφάνιση σαρκώματος Kaposi και λεμφώματος. [37]–[39] Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ιοί προκαλούν καρκίνο είναι αρκετά πιο περίπλοκοι. Οι ιοί θεωρούνται υποχρεωτικά παράσιτα, καθώς χρησιμοποιούν μεταβολικούς μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή για να αντιγραφούν. Εκτελούν αλλαγές στις κυτταρικές δομές, στα μονοπάτια σηματοδότησης αλλά και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Σε ζωικά μοντέλα έχουν παρατηρήσει πως οι ιοί έχουν τη δυνατότητα να κωδικοποιούν ογκοπρωτεΐνες και να ενεργοποιούν μονοπάτια για την δημιουργία όγκων. [33]

Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) αποτελεί τον τρίτο πιο θανατηφόρο καρκίνο παγκοσμίως, με τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης στις ανεπτυγμένες χώρες. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες αποτελούν κίνδυνο για την ανάπτυξη του. Συγκεκριμένα το κάπνισμα, το αλκοόλ, η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η κατανάλωση επεξεργασμένων τροφίμων μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Επίσης, ασθενείς που πάσχουν από φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου. Τα τελευταία χρόνια, ένας μεγάλος αριθμός ερευνών αναφέρει ότι οι μεταβολές στο μικροβίωμα του εντέρου μπορεί να αποτελούν έναν ακόμη παράγοντα που συμβάλλει στην έναρξη και στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου. Μελετώντας τον ιστό ή τα κόπρανα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, έχουν παρατηρήσει αλλαγές στη μικροβιακή σύσταση έναντι υγιών ατόμων. Παρότι η χρήση δείγματος κοπράνων σε σχέση με τον ιστό δίνει διαφορετικά αποτελέσματα, αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο και αποτελεί την πιο συχνά

χρησιμοποιούμενη μέθοδο δειγματοληψίας σε μελέτες μικροβιώματος του εντέρου. Το μικροβίωμα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου είναι συχνά αποτελούμενο από προφλεγμονώδη παθογόνα, καθώς και από μικροοργανισμούς που σχετίζονται με μεταβολικές διαταραχές. Βακτήρια όπως τα *Streptococcus gallolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* και *Enterococcus faecalis* έχουν βρεθεί να είναι αυξημένα στους ασθενείς με CRC, ενώ γένη όπως τα *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* και το *Bifidobacterium* έχουν βρεθεί να είναι μειωμένα. [35][41][42] Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί κάποιος μικροοργανισμός που να εμφανίζεται καθολικά σε μια κατάσταση σε όλους του ασθενείς. Δεδομένης της διακύμανσης στο μικροβίωμα από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι πολύ πιθανό οι μικροοργανισμοί να δρουν συνεργατικά (εικόνα 2). [34]

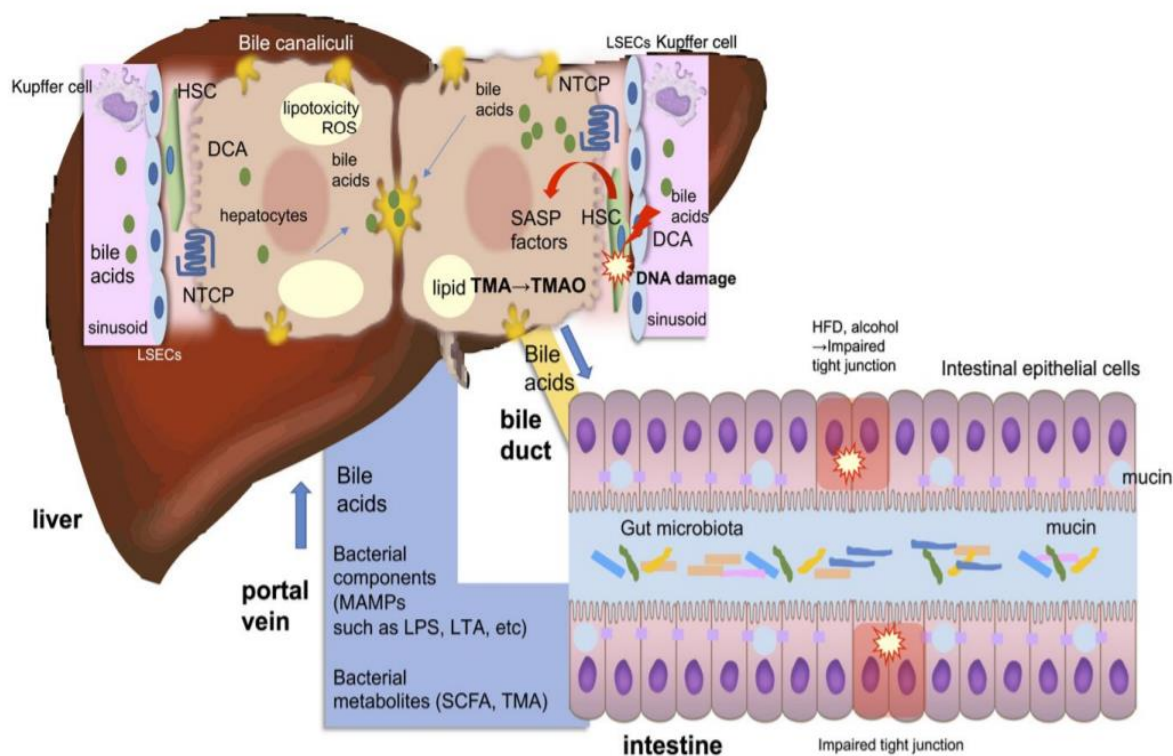


Εικόνα 2. Παράγοντες επηρεασμού του μικροβιώματος του παχέος εντέρου που οδηγούν στην ογκογένεση. Βακτήρια που αποικίζουν το παχύ έντερο σε καταστάσεις καρκίνου. [34]

Καρκίνος του ήπατος

Ο καρκίνος του ήπατος επίσης αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο. Χωρίζεται σε πρωτοπαθή, αν ο καρκίνος έχει ξεκινήσει από το ήπαρ, και σε δευτεροπαθή, αν αποτελεί αποτέλεσμα μετάστασης. Η πιο συχνή αιτία μετάστασης στο ήπαρ είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου. Το μικροβίωμα του

εντέρου, εκτός από την τοπική καρκινογένεση, έχει αποδειχθεί πως εμπλέκεται και στην καρκινογένεση σε απομακρυσμένα όργανα όπως είναι το ήπαρ, το πάγκρεας, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος καθώς και το καρδιαγγειακό σύστημα. Το ήπαρ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, συνδέεται με το γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της πυλαίας φλέβας. Η σύνδεση αυτή αναφέρεται ως “gut-liver axis” (εικόνα 3). Οι διαταραχές στο μικροβίωμα του εντέρου έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα του ήπατος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία χρόνιας ηπατικής νόσου (CLD). Έτσι, εξαιτίας της χρόνιας φλεγμονής στο ήπαρ υπάρχει ένας διαρκής κύκλος τραυματισμού και αναγέννησης των ηπατοκυττάρων, αλλά και μια επιπλέον διαταραχή του μικροβιώματος του εντέρου με τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC). Το εντερικό μικροβίωμα ασθενών με ηπατικές διαταραχές χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση αερόβιων και προφλεγμονωδών βακτηρίων των γενών *Enterobacter*, *Enterococcus* και *Clostridium*. [42]–[45]



Εικόνα 3. Αλληλεπίδραση παχέος εντέρου και ήπατος (gut-liver axis) [43]

Καρκίνος της χοληδόχου κύστης

Ο καρκίνος της χοληδόχου κύστης τον 6^ο πιο συχνό καρκίνο του γαστρεντερικού συστήματος. Αποτελεί μια επιθετική κακοήθεια με κακή πρόγνωση (5ετές ποσοστό επιβίωσης λιγότερο από 5%), διότι συνήθως ανευρίσκεται ως τυχαίο

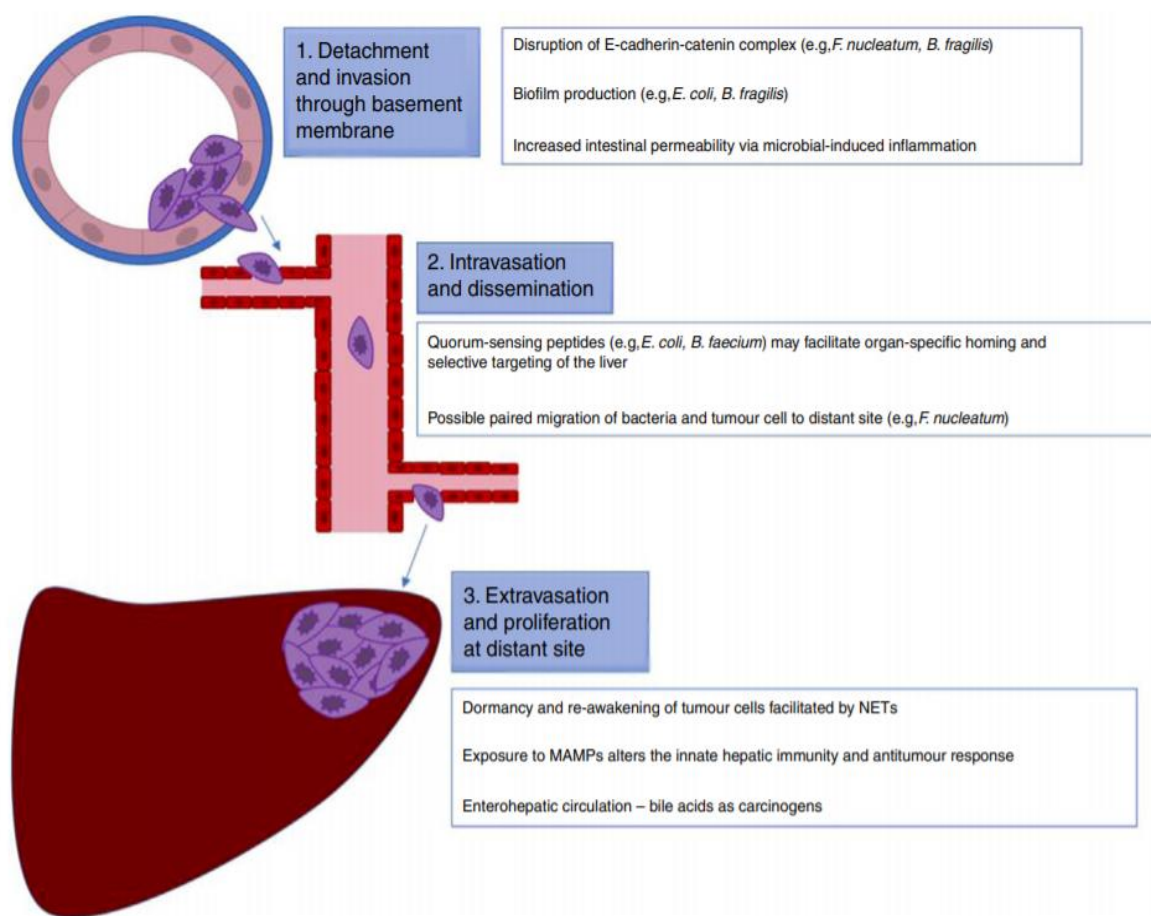
εύρημα. Την πιο συχνή αιτία καρκίνου της χοληδόχου κύστης αποτελεί η χολολιθίαση, εξαιτίας της δημιουργίας χρόνιας φλεγμονής. Άλλοι παράγοντες είναι η πορσελανοειδής χοληδόχος κύστη, η κύστη του χοληδόχου πόρου και η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα. Ακόμη, ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αφαίρεση της χοληδόχου κύστης έχουν αυξημένη πιθανότητα για δημιουργία καρκίνου του παχέος εντέρου εξαιτίας του συνεχούς τραυματισμού του δωδεκαδάχτυλου από την έκκριση χολής. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αιτία για την καρκινογένεση μπορεί να αποτελεί και η λοίμωξη με το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), όπως έχει ήδη προαναφερθεί. Παρόλα αυτά, ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο πως ο καρκίνος της χοληδόχου κύστης συνδέεται με το μικροβίωμα. Μελέτη που συγκρίνει το μικροβίωμα ασθενών με καρκίνο της χοληδόχου κύστης και υγιών ατόμων μέσω των βακτηριακών κυστιδίων των μικροοργανισμών σε αίμα έδειξε πως οι ασθενείς είχαν αυξημένο αριθμό μικροοργανισμών που ανήκουν στις οικογένειες *Bifidobacteriaceae* και *Oxalobacteraceae* *Ralstonia*. [46]–[48] Τέλος, άλλη μελέτη που μελετάει το μικροβίωμα των ασθενών με καρκίνο στη χοληδόχο κύστη και ασθενών με χρόνια χολοκυστίτιδα διαπίστωσε ότι μοιράζονται αρκετά κοινό μικροβίωμα. Γένη όπως τα *Basidioascus*, *Peptostreptococcus*, *Crepidotus* και *Fusobacterium* βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο, όπως και τα species *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium mortiferum*, *Acinetobacter junii* και *Enterococcus faecium*. [49]

1.2.5 Μετάσταση και μικροβίωμα

Η μετάσταση του καρκίνου σε μια δευτερεύουσα θέση αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Τα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να καταφέρουν να αποικίσουν σε μια δεύτερη περιοχή πρέπει να περάσουν από μια σειρά διαδικασιών. Συγκεκριμένα, μετά την ανάπτυξη του πρωταρχικού όγκου, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να μεταναστεύσουν μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος στην δευτερεύουσα θέση, ενώ παράλληλα είναι απαραίτητη η αποφυγή της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε περίπτωση που κάποιος παράγοντας επηρεάσει κάποιο στάδιο της διαδικασίας αυτής, τότε έχουμε αποτυχία μετάστασης. Ενδείξεις δείχνουν ότι το μικροβίωμα του εντέρου, εκτός από την εμπλοκή του στη πρωταρχική ογκογένεση μπορεί να εμπλακεί και σε μονοπάτια της μετάστασης.

Το σύμπλεγμα E-Cadherin/ β -Catenin παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της επιθηλιακής ακεραιότητας. Το *Fusobacterium nucleatum* έχει αποδειχθεί πως μπορεί να διαταράξει το σύμπλεγμα αυτό μέσω ενός λοιμογόνου παράγοντα, του FadA, που εισβάλλει στα καρκινικά κύτταρα. Παρόμοιο παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *Bacteroides fragilis*, το οποίο μπορεί να εκκρίνει μία τοξίνη η οποία είναι ικανή να διασπάσει την E-Cadherin. Με την σειρά του αυτό μπορεί να προκαλέσει έκφραση της N-cadherin, η οποία αυξάνει την κινητικότητα των κυττάρων,

επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να αποκολληθούν από το επιθηλιακό στρώμα. Ακόμα, εξαιτίας της δημιουργίας φλεγμονής, τα επιθηλιακά κύτταρα προβαίνουν σε συνεχή απόπτωση, με αποτέλεσμα η αποφρακτική σύνδεση που δημιουργούν να χαλαρώνει και να αυξάνεται η διαπερατότητα του εντέρου, επιτρέποντας έτσι τη μετατόπιση των μικροοργανισμών στην κυκλοφορία του αίματος (εικόνα 4). Με παρόμοιο τρόπο έχουν βρει ότι μπορούν να μετατοπιστούν και τα ογκοκύτταρα. [50]



Εικόνα 4. Επίδραση του μικροβιώματος του γαστρεντερικού σωλήνα στη μετάσταση του παχέος εντέρου [50]

1.3 Τεχνολογίες Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς – Next Generation Sequencing (NGS) - Μεταγονιδιωματική

Το 1970, ο Sanger μαζί με τους συνεργάτες του κατάφεραν να αναπτύξουν μία μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχίας DNA που βασίζεται στην ενσωμάτωση διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPS) τερματισμού αλυσίδας κατά τη διάρκεια της αντιγραφής DNA in vitro. Η μέθοδος αυτή έδωσε το έναυσμα για την αποκρυπτογράφηση γονιδίων. Αντίθετα με τη μέθοδο των Maxam και Gilbert

(1977), η μέθοδος Sanger απαιτούσε τον χειρισμό λιγότερο τοξικών χημικών στοιχείων, για αυτό και κατέληξε να είναι η επικρατούσα μέθοδος. Χάρη στη shotgun τεχνική (τυχαία τμηματοποίηση του DNA) και τη μέθοδο Sanger, μπόρεσε να ολοκληρωθεί η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2003 [52][53]. Βέβαια, η πρώτη αποκρυπτογράφηση γονιδιώματος DNA είχε επιτευχθεί ήδη το 1977 και αφορούσε τον βακτηριοφάγο ρhix174 [53]. Το πρόγραμμα ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) έδωσε το κίνητρο για την δημιουργία μιας ταχύτερης και φθηνότερης τεχνολογίας. Έτσι, αναπτύχθηκε η τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) που αποτελεί μια μέθοδο ταυτόχρονης αλληλούχησης εκατομμυρίων θραυσμάτων (fragments) DNA. Με αυτή τη διαδικασία παράγονται μικρότερες αλληλουχίες (reads) μήκους 25-500 bp (base pairs, ζευγάρια νουκλεοτιδικών βάσεων), αλλά πολλές εκατοντάδες χιλιάδες ή εκατομμύρια σε αριθμό σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα και με φτηνότερο κόστος συγκριτικά με τη μέθοδο Sanger, όπου η αλληλούχηση γίνεται σε ένα μόνο fragment του DNA κάθε φορά και με μεγαλύτερο κόστος ανά τμήμα [51].

Η τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς επέτρεψε την ανάπτυξη πεδίων της Βιολογίας όπως είναι η γονιδιωματική (genomics) και η μεταγονιδιωματική (metagenomics).

Πριν τη γέννηση μοριακών τεχνικών υπήρχε αδυναμία μελέτης των μικροοργανισμών, καθώς η μόνη μέθοδος που υπήρχε ήταν η καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό. Το μεγαλύτερο ποσοστό όμως των μικροοργανισμών είναι μη καλλιεργήσιμο. Με την εισαγωγή τεχνικών όπως Sanger, FISH και άλλων, επεκτάθηκε η έρευνα των μικροοργανισμών αλλά και πάλι αυτό δεν ήταν αρκετό. Η τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς και η ανάπτυξη της μεταγονιδιωματικής έφερε επανάσταση στον μαζικό προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού και της μελέτης του γενετικού υλικού τους από δείγματα του περιβάλλοντος. Εκτός από τη μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων, η μεταγονιδιωματική ασχολείται και με το ανθρώπινο μικροβίωμα και τις συσχετίσεις του με ασθένειες. [55][56]

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος αλληλούχησης στη μεταγονιδιωματική είναι η 16S rRNA-seq, καθώς είναι πιο φτηνή από την αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος. Το 16S ribosomal RNA (16S Rrna) αποτελεί μια συντηρημένη περιοχή γονιδίου της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας των βακτηρίων που συμμετέχει στην κωδικοποίηση μορίων RNA, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ταξινόμησης των μικροοργανισμών σε επίπεδο γένους (gene) ή/και είδους (species) [56].

Για επιπλέον μελέτες των μικροοργανισμών, πέραν της ταξινόμησης, χρησιμοποιείται η τεχνική RNA sequencing (RNA-seq), όπου ποσότητα RNA απομονώνεται από το δείγμα και προσδιορίζεται ως προς την αλληλουχία με

τεχνολογίες υψηλής απόδοσης (high-throughput technologies). Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατό να μελετηθεί η γονιδιακή έκφραση των μικροοργανισμών τη δεδομένη χρονική στιγμή.

1.4 Human Microbiome Project (HMP)

Η ανάπτυξη των «-omic» πεδίων στη μελέτη της βιολογίας άνοιξε το δρόμο για την εκπόνηση επιδημιολογικών μελετών και μοντελοποιήσεων, με σκοπό το χαρακτηρισμό των μικροβιακών πληθυσμών στις διάφορες περιοχές του ανθρώπινου σώματος και τη συσχέτιση των αλλαγών που υφίστανται με διάφορες ασθένειες και μηχανισμούς. [57]–[59], [61][62]. Ερωτήματα όμως που αφορούν το μικροβίωμα, όπως το πότε διαφορές στη σύσταση του αποτελούν την αιτία μιας κατάστασης και πότε το αποτέλεσμα, η περιγραφή του στις διάφορες υγιείς καταστάσεις όπως π.χ. η εγκυμοσύνη και το πώς συνδέεται με τη φυσιολογία και με διάφορες συγκεκριμένες μοριακές λειτουργίες, ώστε ομάδες ανθρώπων με την ίδια ασθένεια να καταλήγουν να έχουν διαφορές στο μικροβίωμα τους και διαφορετικές εκβάσεις στις θεραπείες και την πρόγνωση, παρέμειναν ανοιχτά. Αυτό δημιούργησε την ανάγκη ερευνητικών έργων μεγάλης έκτασης, με την προοπτική περιγραφής ενός ολοκληρωμένου συστήματος αλληλεπίδρασης του μικροβιώματος με τα υπόλοιπα συστήματα του ανθρώπινου σώματος.

Μία από τις πρώτες προσπάθειες τέτοιων προδιαγραφών αποτέλεσε το Human Microbiome Project (HMP) του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας της Αμερικής. [62] Ξεκινώντας το 2007 [63], έχει ήδη διανύσει μία δεκαετία, προσφέροντας στην επιστημονική κοινότητα πολύτιμα βιολογικά και στατιστικά δεδομένα όπως ακολουθίες αναφοράς μικροβίων που δεν υπήρχαν μέχρι τότε, γονιδιακά, μεταγραφικά και πρωτεϊνικά δεδομένα. Επιπροσθέτως, δόθηκαν στην κοινότητα στατιστικά εργαλεία και πρωτόκολλα τυποποίησης πειραματικών διαδικασιών, τα οποία επιτρέπουν την επανάληψη των πειραμάτων, και τον έλεγχο της εγκυρότητάς τους και την ορθή σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αυτά σε διαφορετικές μελέτες. [64] Συνολικά, παράχθηκαν 42 terabyte multi-omic ελεγμένων δεδομένων, τα οποία είναι προσβάσιμα μέσω του portal του Data Coordination Center (DDC, <http://ihmpdcc.org>) του HMP. Επίσης, έχουν καταχωρηθεί σε δημόσια αποθετήρια για ελεύθερη ή κατόπιν έγκρισης πρόσβαση από τις διάφορες επιστημονικές ομάδες, όπως το Sequence Read Archive (SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), το Database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/>), το Metabolomics Workbench (<https://www.metabolomicsworkbench.org/>) και άλλα.

Το HMP ολοκληρώθηκε σε 2 φάσεις: στην πρώτη φάση (HMP) στόχος ήταν ο χαρακτηρισμός του μικροβιώματος στα διάφορα μέρη του ανθρώπινου σώματος (ρίνα, φάρυγγας, κόλπος, έντερο και δέρμα) κάτω από υγιείς συνθήκες και η

εύρεση κοινών στοιχείων μεταξύ τους. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης πληθυσμοί που παρουσίαζαν συγκεκριμένες ασθενείς καταστάσεις με στόχο την διερεύνηση των διαφορών ως προς τη μικροβιακή σύσταση, τα ένζυμα, τις μεταβολικές λειτουργίες και την επίδραση, σε αυτές, μεταβλητών όπως η φυλή και η εθνικότητα. Εκτός από την προσφορά πληθώρας δεδομένων στους ερευνητές, από αυτήν την πρώτη φάση έγινε αντιληπτό το ότι συχνά δεν αρκεί η συσχέτιση μεταξύ της μικροβιακής σύστασης και του φαινοτύπου του ξενιστή. Για το λόγο αυτό, στη δεύτερη φάση (Integrative HMP/iHMP) η μελέτη επικεντρώθηκε στην εύρεση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μικροβιώματος του ξενιστή και των διαφόρων συστημάτων του, όπως το ανοσοποιητικό και το μεταβολικό, καθώς και των μοριακών λειτουργιών που επιτελούνται στις παρατηρούμενες υγιείς και ασθενείς καταστάσεις. Στόχος ήταν η ολιστική προσέγγιση των μοριακών μηχανισμών του συστήματος ξενιστή/μικροβίωμα, η δυναμική περιγραφή του και η παρατήρηση των καταστάσεων των δειγμάτων εισάγοντας σε αυτές την έννοια του χρόνου. Η ίδια η φιλοσοφία του έργου ενθαρρύνει αυτόν τον τρόπο μελέτης, ιδίως στις μελέτες που σχετίζονται με ασθένειες, όπως επίσης και στην κατασκευή πολυεπίπεδων μεθόδων, πρωτόκολλων και δειγμάτων για την κοινότητα. Οι ασθένειες που επιλέχθηκαν προς μελέτη σε αυτήν τη φάση ήταν η εγκυμοσύνη και ο πρόωρος τοκετός, οι φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου και οι στρεσογόνοι παράγοντες που επηρεάζουν άτομα που εμφανίζουν ενδείξεις μελλοντικής εμφάνισης διαβήτη.

Αναφέρεται ότι με την ολοκλήρωση του iHMP απαντήθηκαν κάποια ερευνητικά ερωτήματα, όμως προέκυψαν ακόμη περισσότερα.. Μελλοντικός στόχος της επιστημονικής κοινότητας πρέπει να αποτελεί ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένων μορίων μέσω των οποίων ενεργοποιούνται και αποσιωποούνται τα διάφορα μοριακά μονοπάτια, η διασαφήνιση του ρόλου συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών ως αιτία ή αποτέλεσμα στις διάφορες παρατηρηθέντες καταστάσεις, η ακόμη πιο εκτενής, ως προς το χρονικό διάστημα, παρατήρηση των δειγμάτων αλλά και η επέκτασή τους ως προς το μέγεθος και την ποικιλία των φυλών, ώστε να προκύπτουν εγκυρότερα και ισχυρότερα στατιστικά συμπεράσματα.

1.5 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση και η σύγκριση του μικροβιώματος ανθρώπινων καρκινικών ιστών με και χωρίς μετάσταση με υγιή δείγματα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά σύνολα δεδομένων (datasets) RNA-seq από τη βάση δεδομένων NCBI GEO [65]. Κάθε ένα από τα 75, συνολικά, δείγματα των τριών datasets περιείχε RNA-seq δεδομένα για τρεις διαφορετικές καταστάσεις (adjacent site, primary tumor site, metastatic site). Η εύρεση κοινών μικροοργανισμών σε ίδιες καταστάσεις ή και η διαφορετική έκφραση/αφθονία συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε διαφορετικές καταστάσεις, αποτελεί τον τελικό στόχο της μελέτης.

2. Μέθοδοι

2.1 Αναζήτηση και επιλογή δειγμάτων

Η εύρεση των RNA-seq δειγμάτων έγινε μέσω της βάσης δεδομένων NCBI GEO. Ο όρος αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των επιθυμητών δειγμάτων ήταν «cancer metastasis RNA-seq». Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν φίλτρα στα αποτελέσματα προκειμένου να συλλεχθούν σύνολα δεδομένων μόνο για τον άνθρωπο.

2.2 Ανάκτηση δειγμάτων

Τα κριτήρια για την επιλογή των datasets ήταν να είναι RNA-seq δεδομένα, να υπάρχει δείγμα από τον ιστό του αρχικού καρκινικού οργάνου (primary cancer), δείγμα ιστού από το αρχικό όργανο χωρίς να έχει γίνει εξάπλωση του καρκίνου σε εκείνο το σημείο (adjacent normal) και δείγμα ιστού από το όργανο που έγινε η μετάσταση (metastatic cancer). Ένα ακόμη κριτήριο για την επιλογή των δεδομένων ήταν να έχει γίνει paired-end αλληλούχηση με τις τεχνολογίες της Illumina. Τελικά, έγινε επιλογή τριών datasets όπου για την εγκυρότητα τους μελετήθηκε η αντίστοιχη δημοσίευση. [66]–[68] Τα 3 αυτά datasets, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2**, περιείχαν καρκίνο της χοληδόχου κύστης (gallbladder cancer) με μετάσταση στο ήπαρ (metastatic liver cancer), καρκίνο του παχέος εντέρου (colorectal cancer) με μετάσταση στο ήπαρ (metastatic liver cancer) καθώς και 3 δείγματα με καρκίνο του παχέος εντέρου χωρίς να υπάρχει μετάσταση σε κάποιο όργανο. Συνολικά, έγινε ανάλυση σε 75 δείγματα (**Πίνακας 2**).

2.3 Συλλογή των δειγμάτων, έλεγχος ποιότητας και προεπεξεργασία αλληλουχιών

Για την απόκτηση του κάθε SRA αρχείου που περιείχε τις αλληλουχίες (reads) του κάθε δείγματος εγκαταστάθηκε το SRA Toolkit [69] και χρησιμοποιήθηκε η εντολή wget. Στη συνέχεια, έγινε μετατροπή των SRA αρχείων σε FASTQ με τη χρήση του αλγόριθμου fastq-dump που περιέχεται στο SRA Toolkit, καθώς με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η παράλληλη μετατροπή τους σε συμπιεσμένα αρχεία.

```
fastq-dump --gzip --split-3 --outdir <path> > file.sra
```

Η παράμετρος “--split-3” δόθηκε προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των paired-end αλληλουχιών σε δύο αρχεία.

Πίνακας 2. Μεταδεδομένα του συνόλου των δειγμάτων της ανάλυσης

Dataset	# of Patients	# of Samples	Extraction tissue	BioProject	Dataset info
1 st	3	9	<ul style="list-style-type: none"> Gallbladder adjacent tumor Gallbladder primary tumor Liver metastasis 	PRJNA546548	<ul style="list-style-type: none"> RNA-seq Paired- end 2019, China Illumina Hiseq 2000
2 nd	6	12	<ul style="list-style-type: none"> Right colon adjacent tumor Right colon primary tumor Liver metastasis Colon tumor without metastasis 	PRJNA358825	<ul style="list-style-type: none"> RNA-seq Paired-end 2018, China Illumina NextSeq 500
3 rd	18	54	<ul style="list-style-type: none"> Colorectal adjacent tumor Colorectal primary tumor Liver metastasis 	PRJNA218851	<ul style="list-style-type: none"> RNA-seq Paired- end 2014, South Korea Illumina Hiseq 2000

Η πρώτη εκτίμηση της ποιότητας των reads έγινε με τη χρήση του FastQC [70]. Επειδή κάθε ένα από τα datasets είχε αναλυθεί σε διαφορετικό εργαστήριο, τα αποτελέσματα του FastQC διέφεραν μεταξύ τους σε σχέση με τους adapters που έχουν χρησιμοποιηθεί, το μέγεθος καθώς και την ποιότητα των reads. Συγκεκριμένα, στο πρώτο dataset ανιχνεύθηκε η ύπαρξη του Illumina Universal Adapter. Όπως φαίνεται από την **Εικόνα 5**, ο adapter ξεκινάει από την 90 περίπου βάση των reads, όμως στη λίστα του FastQC με τους adapter η αλληλουχία περιέχει λιγότερες βάσεις, "AGATCGGAAGAG". Η σύντομη αυτή ακολουθία χρησιμοποιείται από την Illumina για να επισημάνει την έναρξη της ακολουθίας του adapter. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε και ο αλγόριθμος MinION [71] όπου εντόπισε adapters με περισσότερες βάσεις.

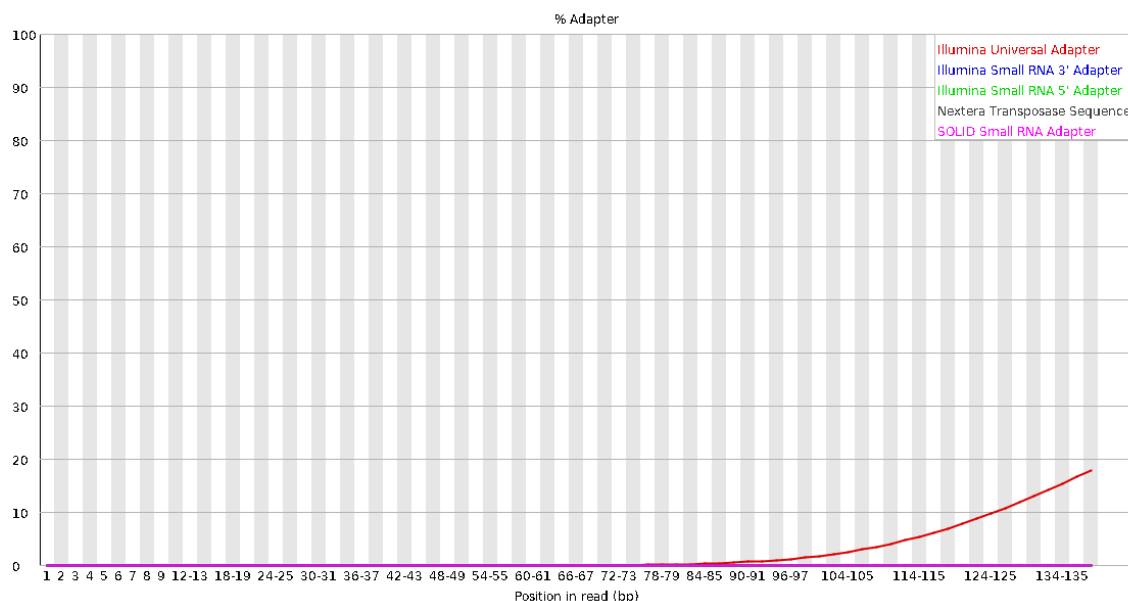
```
./minion search-adapter -i reads_1.fastq
./minion search-adapter -i reads_2.fastq
```

Στη συνέχεια, για την αφαίρεση των adapters χρησιμοποιήθηκε το cutadapt για κάθε ένα από τα 75 δείγματα [72]. Όσα reads είχαν μήκος μικρότερο των 40 βάσεων αφαιρέθηκαν.

```
cutadapt -a Adapter_FWD -A Adapter_REV -o out_1.fastq.gz -p out_2.fastq.gz
reads_1.fastq reads_2.fastq -j 8 -m 40
```

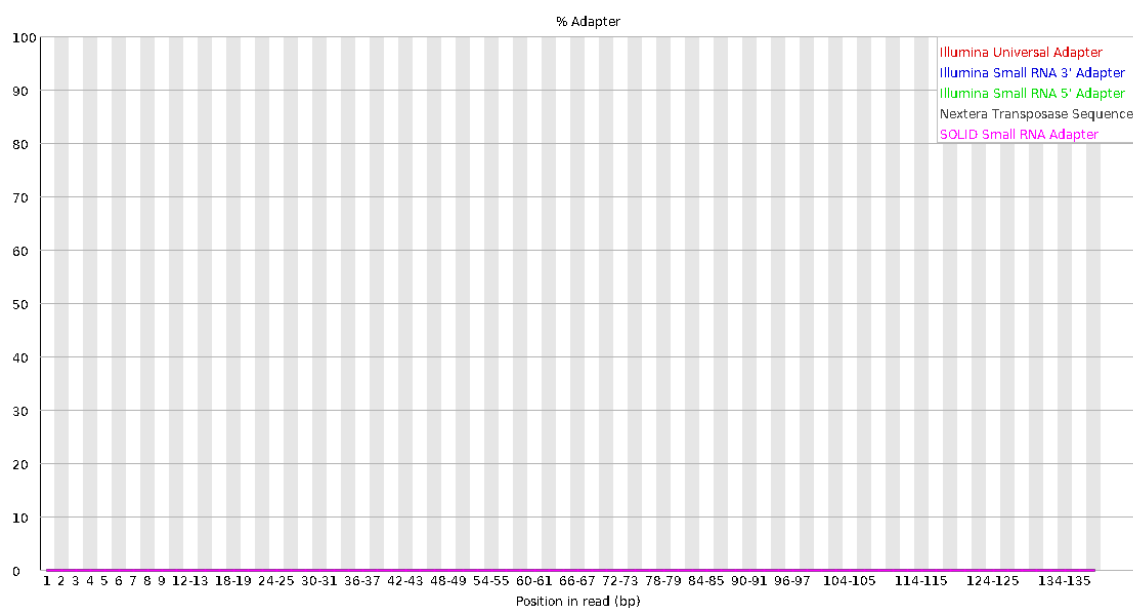
Τέλος, ξανά έγινε έλεγχος των δειγμάτων του 1^{ου} dataset με FastQC. (**εικόνα 6**)

✘ Adapter Content



Εικόνα 5. Αποτελέσματα του αλγορίθμου fastQC για την ύπαρξη adapter στο dataset 1

✔ Adapter Content



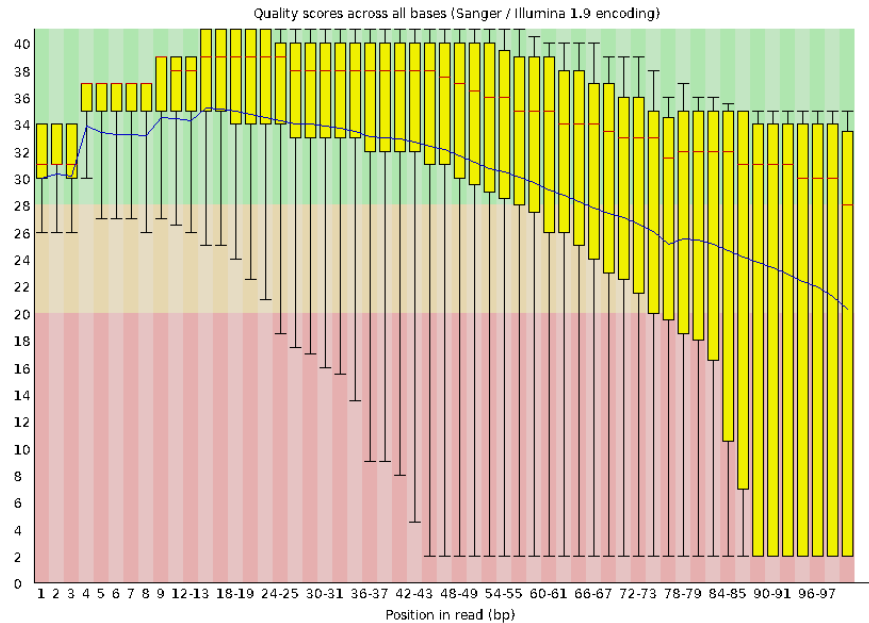
Εικόνα 6. Αποτελέσματα του αλγορίθμου fastQC μετά την αφαίρεση του adapter στο dataset 1

Τα αποτελέσματα του FastQC για το 2^ο dataset έδειξαν πως είχε γίνει ήδη pre-processing. Παρόλα αυτά, για λόγους συνέπειας της μελέτης, εφόσον στο 1^ο dataset το μικρότερο μήκος reads που επιλέχθηκε για τη συνέχεια της ανάλυσης ήταν οι 40 βάσεις, ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα προεπεξεργασίας και για το 2^ο dataset. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το cutadapt.

```
cutadapt -j 8 -m 40 -o out_1.fastq -p out_2.fastq reads_1.fastq reads_2.fastq
```

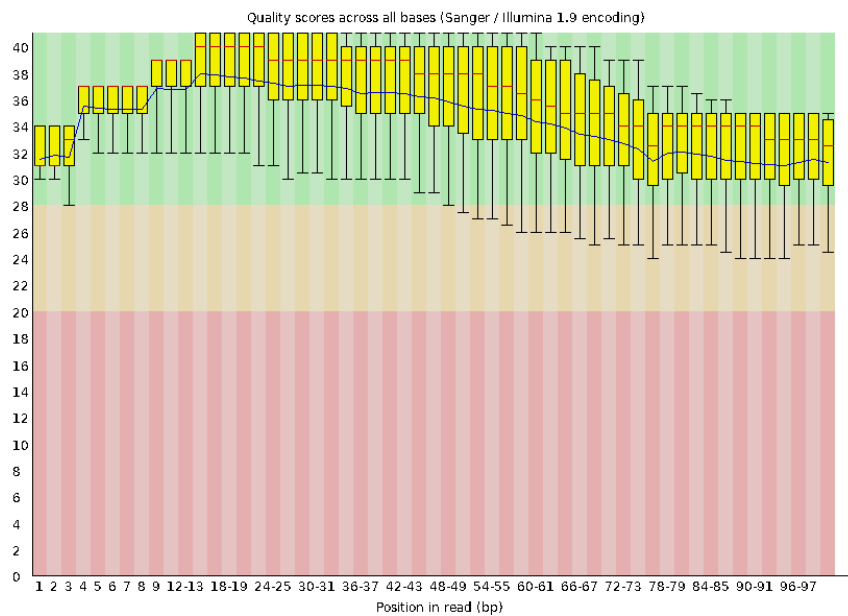
Τέλος, όσον αφορά το 3^ο dataset, το FastQC έδειξε πως η ποιότητα των βάσεων προς το τέλος των αλληλουχιών μειώνεται κάτω από 10 quality score. (Εικόνα 7) Με χρήση του cutadapt έγινε αφαίρεση των βάσεων που είχαν score κάτω από 10, καθώς και των reads με μήκος μικρότερο των 40 βάσεων. (Εικόνα 8)

 Per base sequence quality



Εικόνα 7. Αποτελέσματα του αλγορίθμου fastQC για την ποιότητα των βάσεων των reads στο dataset 3

 Per base sequence quality



Εικόνα 8. Αποτελέσματα του αλγορίθμου fastQC μετά την αφαίρεση των βάσεων με χαμηλή ποιότητα στο dataset 3

Αφού πραγματοποιήθηκε η απαραίτητη προεπεξεργασία, έγινε έλεγχος όλων των δειγμάτων για orphan reads (αλληλουχίες που χάθηκε το mate τους κατά τη διαδικασία του pre-processing). Για τον σκοπό αυτό έγινε χρήση του αλγορίθμου Pairfq. [73]

```
./pairfq_lite makepairs -f out_1.fastq -r out_2.fastq -fp reads_1.fastq -rp reads_2.fastq -fs orphan_reads_1.fastq -rs orphan_reads_2.fastq
```

2.4 Στοίχιση αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα

Σε επόμενο βήμα, έγινε στοίχιση των reads του κάθε FASTQ δείγματος στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ύστερα έγινε συλλογή όσων reads απέτυχαν να στοιχισθούν, με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή προέλευσή τους από μικροβιακούς οργανισμούς.

Η στοίχιση των reads έγινε με τον αλγόριθμο HISAT2 [74]. Ο HISAT2 (Hierarchical Indexing For Spliced Alignment of Transcripts 2) είναι ένας αλγόριθμος στοίχισης (aligner) ο οποίος μπορεί να αντιστοιχίσει ακολουθίες που έχουν προκύψει τόσο από DNA όσο και από RNA. Χρησιμοποιεί έναν FM-index (Feragina Manzini index) εφαρμοσμένο σε γράφους, επιτρέποντας τη γρήγορη και ευαίσθητη εξερεύνηση του γονιδιώματος αναφοράς για στοιχίσεις των reads, καθώς και την αντιστοίχιση σε διαφορετικούς απλότυπους. Επιπλέον, ο HISAT2 δέχεται σαν είσοδο στη δομή του index πληροφορία για περιοχές ματίσματος μεταγράφων (splice sites). Ως γονιδίωμα αναφοράς (reference genome) του ανθρώπου χρησιμοποιήθηκε από την σελίδα του HISAT2 το GRCh38 (Homo sapiens).. Το αρχείο εξόδου (output) του HISAT2 είναι ένα SAM αρχείο, ενώ παράγονται επίσης κάποια στατιστικά στοιχεία σε σχέση με την αντιστοίχιση, τα οποία εμφανίζονται στην οθόνη εξόδου. **(Εικόνα 9)**

```
hisat2 -q -x grch38_tran --un-conc-gz unpaired_reads.fastq.gz -p 8 -1 reads_1.fastq -2 reads_2.fastq -S output.sam
```

Στη συνέχεια, αφού μετατράπηκαν τα SAM αρχεία σε BAM, έγινε εξαγωγή από το BAM αρχείο όσων reads δεν κατάφεραν να στοιχιστούν στο ανθρώπινο γονιδίωμα και χωρίστηκαν σε δύο αρχεία, λόγω της τεχνικής paired-end..

```
samtools view -b -f 12 -F 256 file.bam > unmapped_reads.bam  
samtools bam2fq unmapped_reads.bam > unmapped_reads.fastq  
cat unmapped_reads.fastq | grep '^@.* /1$' -A3 -no-group-separator >  
unmapped_mate_1.fastq  
cat unmapped_reads.fastq | grep '^@.* /2$' -A3 -no-group-separator >  
unmapped_mate_2.fastq
```

```

22859398 reads; of these:
  22859398 (100.00%) were paired; of these:
    2186787 (9.57%) aligned concordantly 0 times
    13351659 (58.41%) aligned concordantly exactly 1 time
    7320952 (32.03%) aligned concordantly >1 times
  ----
    2186787 pairs aligned concordantly 0 times; of these:
      221442 (10.13%) aligned discordantly 1 time
  ----
    1965345 pairs aligned 0 times concordantly or discordantly; of these:
      3930690 mates make up the pairs; of these:
        2014818 (51.26%) aligned 0 times
        1087780 (27.67%) aligned exactly 1 time
        828092 (21.07%) aligned >1 times
95.59% overall alignment rate

```

Εικόνα 9. Αποτελέσματα για τη στοίχιση των reads στο ανθρώπινο γονιδίωμα με χρήση του αλγορίθμου HISAT2

2.5 Στοίχιση μη στοιχισμένων αλληλουχιών με χρήση εργαλείων μεταγονιδιωματικής για ταυτοποίηση

Για τη στοίχιση των reads που δεν στοιχίστηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος μεταγονιδιωματικής του εργαστηρίου DIANA-Lab, AGAMEMNON. Το πρόγραμμα AGAMEMNON χρησιμοποιεί τα γνωστά γονιδιώματα μικροοργανισμών που δίνει ο χρήστης προκειμένου να κατασκευάσει μία δομή (Suffix Array), η οποία περιέχει όλες τις δυνατές αλληλουχίες που υπάρχουν στα γονιδιώματα, με λεξικογραφική οργάνωση. Έτσι, όταν επιχειρείται να στοιχηθεί μία αλληλουχία που περιέχεται στο δείγμα, το πρώτο k-μερές της εντοπίζεται σε μια περιοχή της δομής με μία συνάρτηση/πίνακα κατακερματισμού και στη συνέχεια επεκτείνεται κατάλληλα, ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα να προέρχεται από την περιοχή υπολογισμού.

Για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν όλα τα γονιδιώματα των μικροοργανισμών που έχουν αναλυθεί από το Human Microbiome Project (BioProject PRJNA28331). Επειδή τα datasets που επιλέχθηκαν προς μελέτη δεν ήταν σχεδιασμένα για τη μελέτη του μικροβιώματος αλλά για τη διερεύνηση της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπου, ήταν απαραίτητη η αφαίρεση των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο δέρμα για να αποφευχθεί η πιθανότητα εντοπισμού τους εξαιτίας πιθανού επιπολασμού (contamination) των δειγμάτων κατά την δειγματοληψία των ιστών. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε ένα script σε Perl. Συνοπτικά, το script διαβάζει ένα αρχείο τύπου text (txt), στο οποίο βρίσκεται η λίστα με όλους τους μικροοργανισμούς που έχουν βρεθεί στο δέρμα και τους αποθηκεύει σε έναν πίνακα. Στη συνέχεια, γίνεται διάβασμα του FASTA αρχείου, από το οποίο θα γίνει η αφαίρεση των μικροοργανισμών του δέρματος και αφαιρούνται οι χαρακτηριστικές νέες γραμμές (“\n”) από τις ακολουθίες. Τέλος, με την βοήθεια των regular

expressions (regex) γράφονται σε νέο FASTA αρχείο όσοι μικροοργανισμοί δεν βρέθηκαν στον πίνακα που περιέχει τους μικροοργανισμούς του δέρματος.

Πρώτο στάδιο του αλγορίθμου AGAMEMNON ήταν η κατασκευή του index με το σύνολο των μικροβιακών γονιδιωμάτων.

```
./pufferfish index -r <fasta_file_with_selected_genome> -k 31 -p  
<number_of_threads> -o <output_directory>
```

Στο δεύτερο στάδιο του αλγορίθμου, έγινε στοίχιση των reads του κάθε sample που δεν αντιστοιχήθηκαν στον άνθρωπο στο σύνολο των μικροβιακών γονιδιωμάτων.

```
./pufferfish align -i <pufferfish_index_directory> --mate1 <sample_mate_1.fq> -  
-mate2 <sample_mate_2.fastq> --coverageScoreRatio 0.65 --threads  
<number_of_threads> -p -o <output_dir/mappings.pam>
```

Στο τρίτο στάδιο του αλγορίθμου, έγινε ποσοτικοποίηση των μικροβιακών πληθυσμών (reads).

```
./cedar --flat --puffMapperOut <mappings.pam> --output <output_dir/quant.sf>  
--threads <number_of_threads> --minCnt 2
```

Τέλος, έγινε εκτέλεση ενός ακόμα script του AGAMEMNON, προκειμένου για κάθε μικροοργανισμό που βρέθηκε να αναφέρεται η αντίστοιχη ταξινομική κατάταξη.

```
python getTaxonomy -qf quant.sf -tfd <taxonomy_folder_dir> -od <output_dir>
```

3. Αποτελέσματα

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναγράφονται για κάθε δείγμα το σύνολο των reads που προέκυψε κατά την εκτέλεση του κάθε βήματος της ανάλυσης. Για το λόγο ότι για την αλληλούχιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε paired-end πρωτόκολλο, τα ποσά του πίνακα αναφέρονται ανά μέλος του ζεύγους των reads (mate).

Πίνακας 3. Σύνολο reads ανά βήμα εκτέλεσης

Dataset	Sample	Tissue	Total mates	Cutadapt	pairfq_lite	HISAT2 mapped	HISAT2 unmapped	AGAMEMNON mapped
1	1	adjacent	74554666	74518651	74518651	70236796	4281855	70581
1	1	primary	75483981	75460693	75460693	69336747	6123946	173819
1	1	metastatic	72366770	72340073	72340073	68907501	3432572	21117
1	2	adjacent	98433472	98382576	98382576	90756739	7625837	1768630
1	2	primary	81334363	81304543	81304543	76285073	5019470	39453
1	2	metastatic	96695754	96661321	96661321	90614141	6047180	34989
1	3	adjacent	67617155	67591929	67591929	57282606	10309323	6884357
1	3	primary	77259545	77223949	77223949	71776339	5447610.00	440330
1	3	metastatic	78644509	78621746	78621746	73979069	4642677	389724
2	1	adjacent	21098021	19160950	19160950	15806287	3354663	74567
2	1	primary	32021584	31510955	31510955	24551700	6959255	23781
2	1	metastatic	31071769	30947634	30947634	24425001	6522633	7036
2	2	adjacent	25219138	25160785	25160785	20305955	4854830	22150
2	2	primary	36175591	36104976	36104976	28769873	7335103	8703
2	2	metastatic	36135659	35940375	35940375	27752391	8187984	62715
2	3	adjacent	60553778	58798594	58798594	49939789	8858805	42332
2	3	primary	43567580	42324864	42324864	35658488	6666376	7814
2	3	metastatic	25608342	25535010	25535010	19538830	5996180	10945
2	4	primary without metastasis	35739278	34200367	34200367	28529196	5671171	27272
2	5	primary without metastasis	45807078	35123964	35123964	22498993	12624971	95742
2	6	primary without metastasis	21721036	19129364	19129364	14653145	4476219	26424
3	1	adjacent	34723569	29586002	29586002	28061612	1524390	9321
3	1	primary	39246774	33732860	33732860	32548741	1184119	8038
3	1	metastatic	34208059	29530867	29530867	28524967	1005900	5821
3	2	adjacent	14539177	12516416	12516416	12014431	501985	2934
3	2	primary	33790908	28728025	28728025	27679896	1048129	9852
3	2	metastatic	36752877	31360002	31360002	30124942	1235060	6515
3	3	adjacent	41683680	35819773	35819773	33942949	1876824	229302
3	3	primary	27098975	23034951	23034951	21976745	1058206	41903
3	3	metastatic	35647306	30880387	30880387	29640656	1239731	23768
3	4	adjacent	31641166	27148050	27148050	25843261	1304789	7467
3	4	primary	34561683	29967535	29967535	28805766	1161769	17244
3	4	metastatic	26616873	23269049	23269049	22389894	879155	9994
3	5	adjacent	24129442	21130438	21130438	19816760	1313678	7127
3	5	primary	35233406	30993020	30993020	29540933	1452087	12899

3	5	metastatic	32911282	29774563	29774563	27985762	1788801	9136
3	6	adjacent	32141891	27808991	27808991	26196865	1612126	14739
3	6	primary	30901193	26877445	26877445	25713536	1163909	9307
3	6	metastatic	23684171	20635242	20635242	19850867	784375	2984
3	7	adjacent	36515747	31730828	31730828	30087809	1643019	7699
3	7	primary	26818445	23215196	23215196	22257557	957639	3195
3	7	metastatic	39151677	33721759	33721759	32312189	1409570	6283
3	8	adjacent	33949389	29365470	29365470	28038150	1327320	8127
3	8	primary	34916511	30071446	30071446	28712216	1359230	6511
3	8	metastatic	24054270	21118081	21118081	20326153	791928	2305
3	9	adjacent	33339729	28358828	28358828	26472965	1885863	15944
3	9	primary	29076623	24746591	24746591	23608248	1138343	6956
3	9	metastatic	24967011	21181171	21181171	20206837	974334	5404
3	10	adjacent	22296846	19631674	19631674	18516595	1115079	11136
3	10	primary	33198453	27970216	27970216	26622051	1348165	4614
3	10	metastatic	27299107	23981686	23981686	22991242	990444	2465
3	11	adjacent	18900114	16403297	16403297	15612658	790639	3104
3	11	primary	23182263	20606058	20606058	19600482	1005576	6074
3	11	metastatic	25974445	22417985	22417985	21427110	990875	6680
3	12	adjacent	32860754	29055054	29055054	27579057	1475997	10498
3	12	primary	28634384	25517716	25517716	24458730	1058986	6478
3	12	metastatic	28659374	25169264	25169264	24089502	1079762	4722
3	13	adjacent	23744963	20216606	20216606	18835812	1380794	4664
3	13	primary	42579746	36502119	36502119	34450699	2051420	11440
3	13	metastatic	29567657	26717571	26717571	25696959	1020612	2690
3	14	adjacent	32167292	27791600	27791600	25851746	1939854	7744
3	14	primary	32527490	27893755	27893755	26457226	1436529	9844
3	14	metastatic	27702790	24150190	24150190	22824344	1325846	8539
3	15	adjacent	24340723	21576010	21576010	20391487	1184523	4453
3	15	primary	25052890	22238449	22238449	21277748	960701	4499
3	15	metastatic	30482187	26821086	26821086	25665097	1155989	6012
3	16	adjacent	23057378	20227317	20227317	18948950	1278367	7644
3	16	primary	23975764	20802357	20802357	19606221	1196136	3660
3	16	metastatic	26361579	22859398	22859398	21851298	1008100	1950
3	17	adjacent	33869523	28960245	28960245	27074933	1885312	17096
3	17	primary	30826267	26511709	26511709	25003192	1508517	12688
3	17	metastatic	42241052	36839270	36839270	35004674	1834596	9524
3	18	adjacent	31174398	27062660	27062660	25790715	1271945	11477
3	18	primary	27450636	23972209	23972209	22646545	1325664	8390
3	18	metastatic	39416284	34555434	34555434	33142116	1413318	5442

Ανοίγοντας το τελικό αρχείο του AGAMEMNON (.results), με τη βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού R, εμφανίζεται για κάθε μικροοργανισμό που βρέθηκε στο εκάστοτε δείγμα όλη η ταξινομική κατάταξη, ξεκινώντας από το SuperKingdom έως το Sub-Species/Strain (Scientific_name) και τέλος τα αντίστοιχα read counts.

Το αρχείο εξόδου συγκεκριμένα περιέχει τις παρακάτω στήλες:

- SuperKingdom

- Phylum
- Class
- Order
- Family
- Genus
- Species
- Scientific_name
- TaxID
- NumCounts

Για κάθε ένα από τα 75 δείγματα προέκυψε ένας πίνακας με τους μικροοργανισμούς που εντοπίστηκαν, καθώς και τα read counts. Επόμενο βήμα ήταν η διεξαγωγή ανάλυσης διαφορικής αφθονίας (differential abundance analysis) για κάθε ζεύγος καταστάσεων (adjacent vs metastatic, adjacent vs primary, primary vs metastatic), αφού πρώτα έγινε κανονικοποίηση των read counts.

Αρχικά, κάθε dataset μελετήθηκε ξεχωριστά, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ένωση όλων με σκοπό όλα τα δείγματα να μελετηθούν ως ένα συνολικό dataset και να αυξηθεί η στατιστική δύναμη της μελέτης. Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η διεπαφή που προσφέρει ο AGAMEMNON, η οποία έχει φτιαχτεί με το R πακέτο Shiny. [75] Η στατιστική μελέτη έγινε με τα πακέτα metagenomeSeq [76] και edgeR [77].

Ως αρχεία εισόδου, ο AGAMEMNON δέχεται ένα αρχείο στηλών χωρισμένο με τον ειδικό χαρακτήρα tab, το οποίο περιέχει τα ονόματα των δειγμάτων, την κατηγορία στην οποία ανήκουν και τα αρχεία εξόδου “.results”.

Το αρχείο εξόδου του AGAMEMNON είναι ένας πίνακας που περιέχει τις παρακάτω στήλες:

- TaxID
- present.in.N.samples.in.group.0
- present.in.N.samples.in.group.1
- Counts.in.group.0
- Counts.in.group.1
- logFC
- se
- PValue
- FDR
- foldchange
- qValue
- Local.FDR"

Ως στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρήθηκαν όσες συγκρίσεις (primary vs metastasis, adjacent vs metastasis, adjacent vs primary) είχαν False Discovery Rate (FDR) ≤ 0.05 . Επιπλέον, εφαρμόστηκε ένα επιπλέον φίλτρο και διατηρήθηκαν οι μικροοργανισμοί όπου τουλάχιστον μία από τις δύο καταστάσεις υπό σύγκριση έχει reads counts > 50 . Έχοντας καταλήξει με τρεις πίνακες, εκ των οποίων ο κάθε ένας περιέχει στατιστικά σημαντικούς μικροοργανισμούς, μέσω της γλώσσας προγραμματισμού R εντοπίστηκαν οι στατιστικά σημαντικοί μικροοργανισμοί που είναι κοινói στα αποτελέσματα των συγκρίσεων adjacent vs metastasis και adjacent vs primary και που δεν είναι στατιστικά σημαντικοί στη σύγκριση primary vs metastasis.

Επιλέγοντας αρχικά το πακέτο metagenomeSeq, έγινε εκτέλεση για κάθε ένα από τα τρία dataset. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα έδειξαν μόνο τα δείγματα που ανήκουν στο dataset 1. **(Εικόνα 10 & Πίνακας 4)**

Πίνακας 4. Αποτελέσματα του metagenomeSeq για το dataset 1

TaxID	Rank	Adjacent counts	metastatic counts	FDR_aVSm	Adjacent counts	Primary counts	FDR_aVSp
Veillonella sp. 6_1_27	Species	162	0	0.0145	162	0	0.0061
Abiotrophia defectiva ATCC 49176	Strain	57	0	0.0002	57	2	0.0137
Paraprevotella xylaniphila YIT 11841	Strain	166	15	3.8814e-05	165	47	6.2910e-09
Dialister microaerophilus DSM 19965	Strain	4687	1104	6.5708e-06	4687	623	0.0245
Enterococcus casseliflavus ATCC 12755	Strain	380	3	0.0282	380	0	1.3651e-06
Oscillibacter sp. KLE 1728	Species	171	0	0	171	0	0
Clostridium sp. KLE 1755	Species	565	86	1.6111e-12	565	117	0

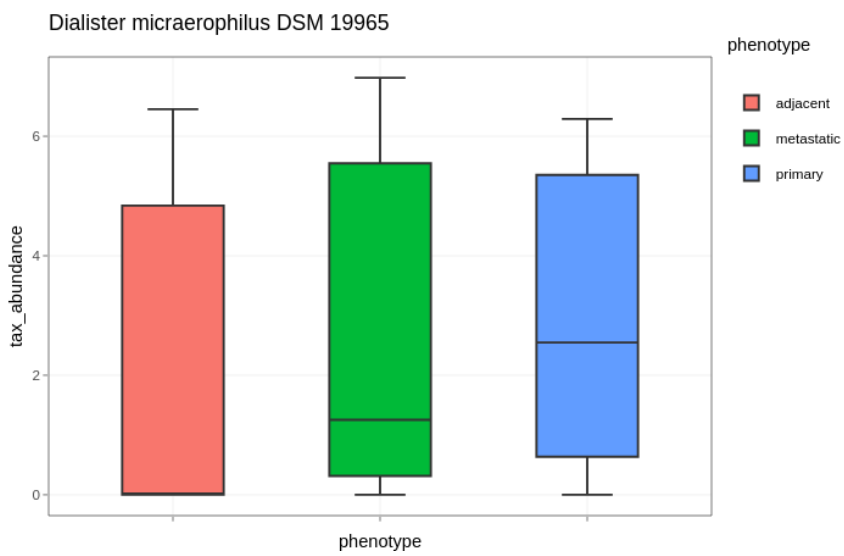
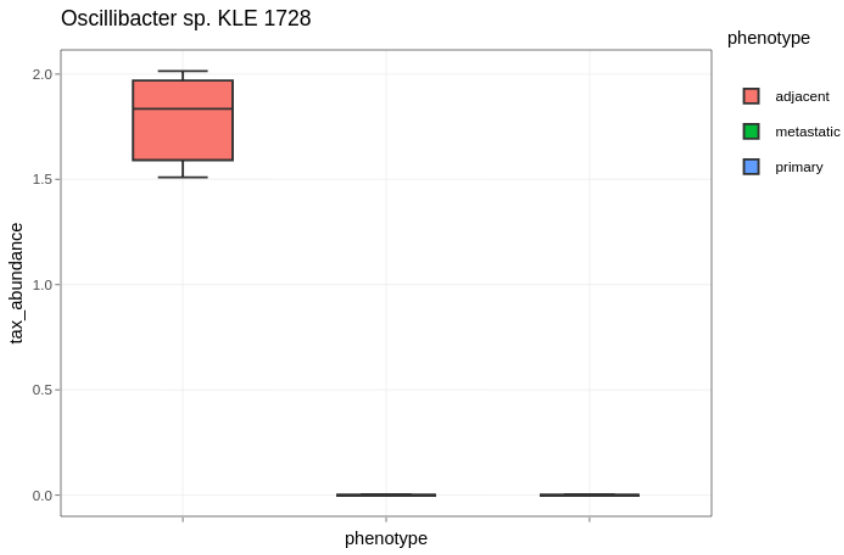
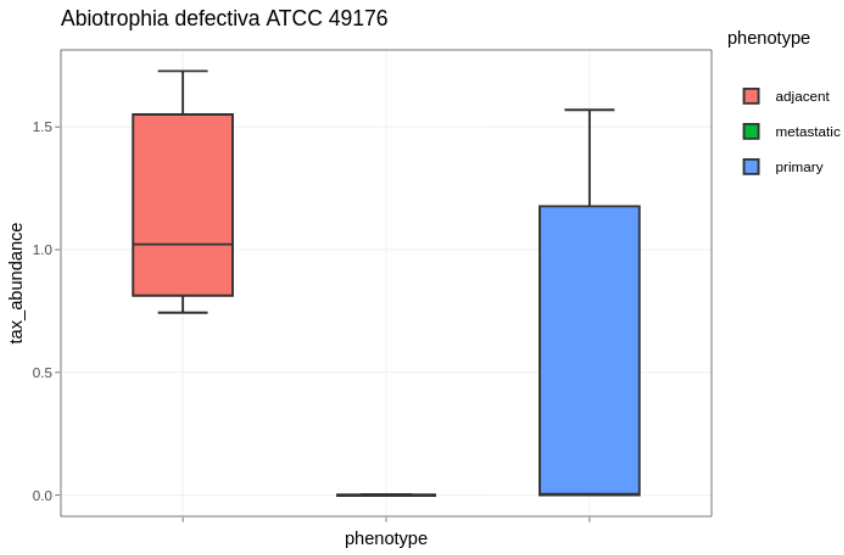
Providencia alcalifaciens 205/92	Strain	89	0	0.0034	89	0	0.0002
Corynebacterium sp. HMSC072A04	Species	112	0	8.3311e-06	1129	0	1.2170e-08

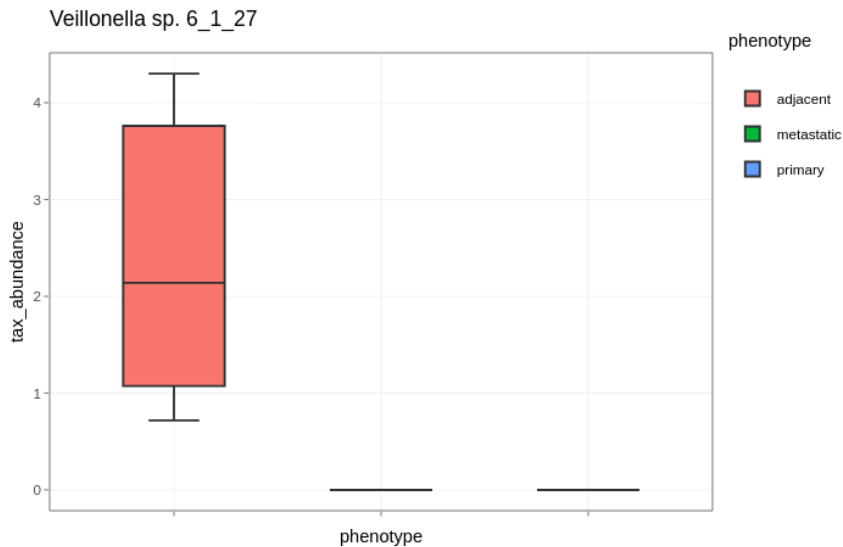
Παρατηρούμε πως στο dataset 1, που αφορά τα δείγματα με καρκίνο της χοληδόχου κύστης (**Πίνακας 4**), το βακτήριο *Veillonella* έχει βρεθεί μόνο στην κατάσταση adjacent. Σε έρευνα για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός βρέθηκε υψηλότερα εκφρασμένος στους υγιείς, καταλήγοντας στο ότι μπορεί να δρα προστατευτικά ενάντια στον καρκίνο. [78] Σε άλλη έρευνα που αφορούσε τον καρκίνο του παχέος εντέρου, η *Veillonella* δρα ως προ-φλεγμονώδης παράγοντας. [79] Αντίθετα, στον καρκίνο του ήπατος έχει παρατηρηθεί ότι το βακτήριο αυτό έχει θετική συσχέτιση με τον καρκινικό βιοδείκτη alpha-fetoprotein (AFP). [80]

Οι μικροοργανισμοί *Abiotrophia* και *Oscillibacter* έχουν βρεθεί αυξημένοι σε υγιείς έναντι ασθενών που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα και νόσο του Crohn. [81] Στα δείγματα του dataset 1, επίσης βρέθηκαν αυξημένοι στην κατάσταση adjacent έναντι των καρκινικών καταστάσεων. Ο *Oscillibacter* έχει παρατηρηθεί να είναι αυξημένος σε φυσιολογικό ιστό παχέος εντέρου έναντι καρκινικού, με το φαινόμενο αυτό να αποδίδεται στη συσχέτισή του με τη βιοσύνθεση στεροειδών και τερπενοειδών [82], ενώ ο *Abiotrophia* έχει βρεθεί αυξημένος σε ασθενείς με καρκίνο του γαστρικού σωλήνα. [83]

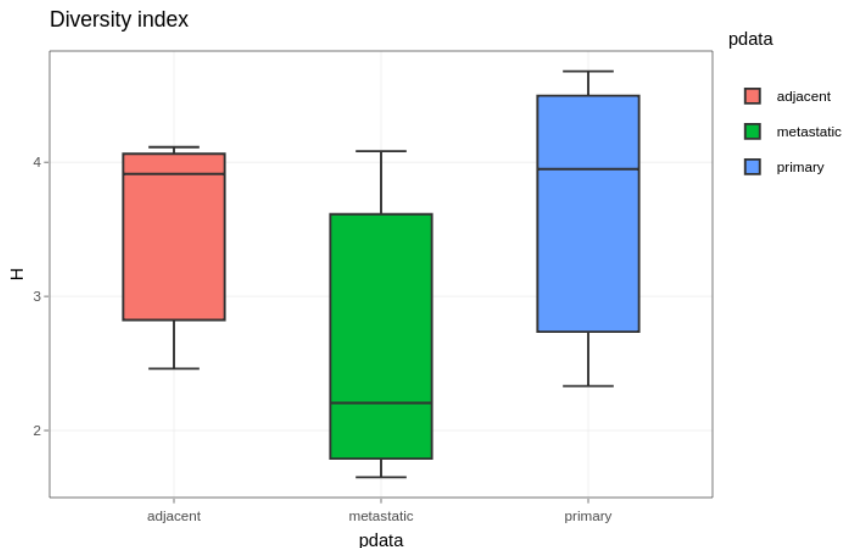
Ο μικροοργανισμός *Clostridium sp.* επίσης έχει δειχθεί να κατέχει αντικαρκινικό ρόλο, μέσω της έγερσης αντισωμάτων ενάντια στον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1, ο οποίος εμπλέκεται σε ρυθμιστικά μονοπάτια που σχετίζονται με καρκίνο, καθώς και μέσω της παραγωγής κυτοκινών και τοξινών που επιτίθονται στα καρκινικά κύτταρα, όπως οι TNF- α , IL-2 και IL-12. [84]–[86]

Το γένος *Dialister* βρέθηκε να αυξάνεται μετά το χειρουργείο σε ασθενείς με καρκίνο του γαστρικού σωλήνα, ενώ και στην adjacent κατάσταση του dataset 1 βρέθηκε επίσης ένα στέλεχος να είναι αυξημένο. [87]





Εικόνα 10. Βoxplots μικροοργανισμών που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικοί στο dataset 1



Εικόνα 11. Shannon index για το dataset 1

Στο παραπάνω boxplot που απεικονίζει τη σύγκριση του Shannon index για κάθε κατάσταση (εικόνα 11) παρατηρούμε πως η κατάσταση primary παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Στη συνέχεια, ακολουθεί η κατάσταση adjacent και τέλος η κατάσταση metastatic. Οι καταστάσεις primary και adjacent έχουν σχεδόν ίδιο median και συγκριτικά με την κατάσταση metastatic είναι πιο κοντά. Πιθανή αιτία είναι η κοινή προέλευση ιστού από το ίδιο όργανο.

Παρότι τα υπόλοιπα datasets δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα των συγκρίσεων primary vs metastasis, adjacent vs metastasis και adjacent vs primary, η σύγκριση των δειγμάτων του dataset 2 από τον ιστό colon primary που παρουσίασε στη συνέχεια μετάσταση με τον ιστό colon cancer

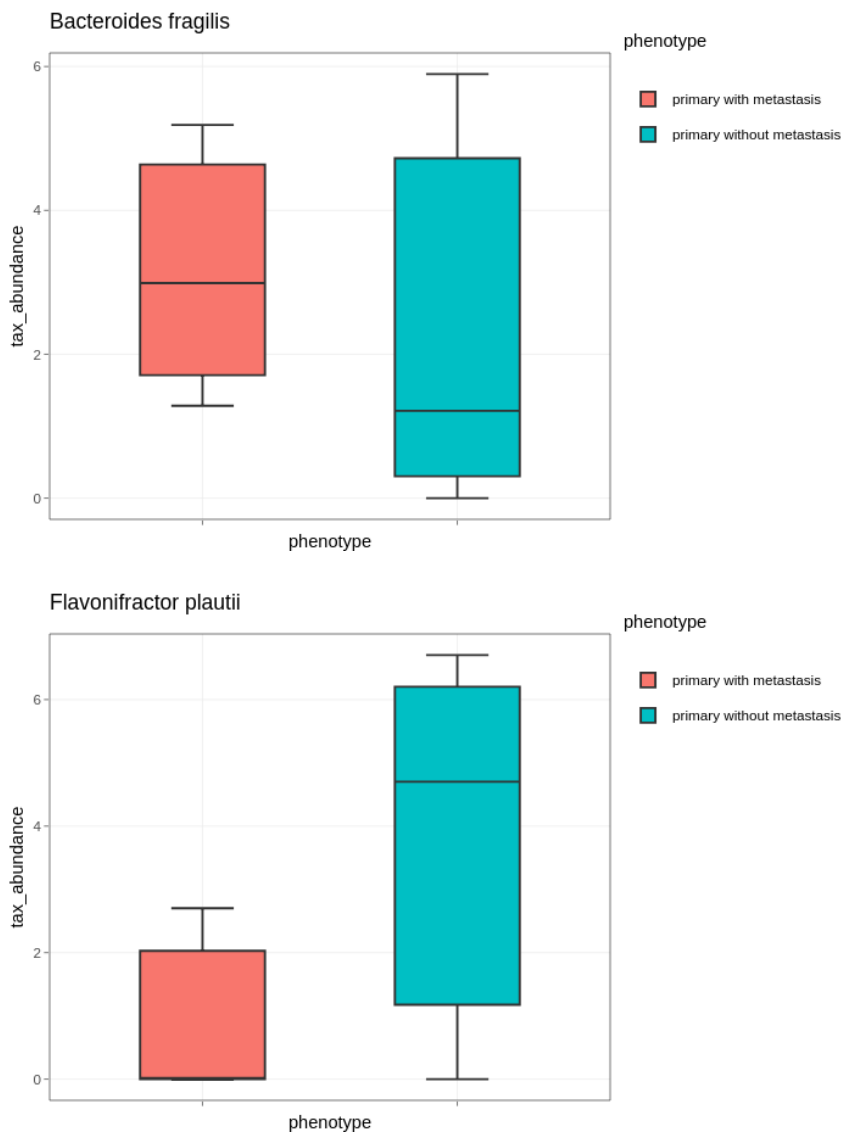
χωρίς μετέπειτα μετάσταση έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. (Εικόνα 12 & Πίνακας 5)

Πίνακας 5. Αποτελέσματα του *metagenomeSeq* για το *dataset 2*

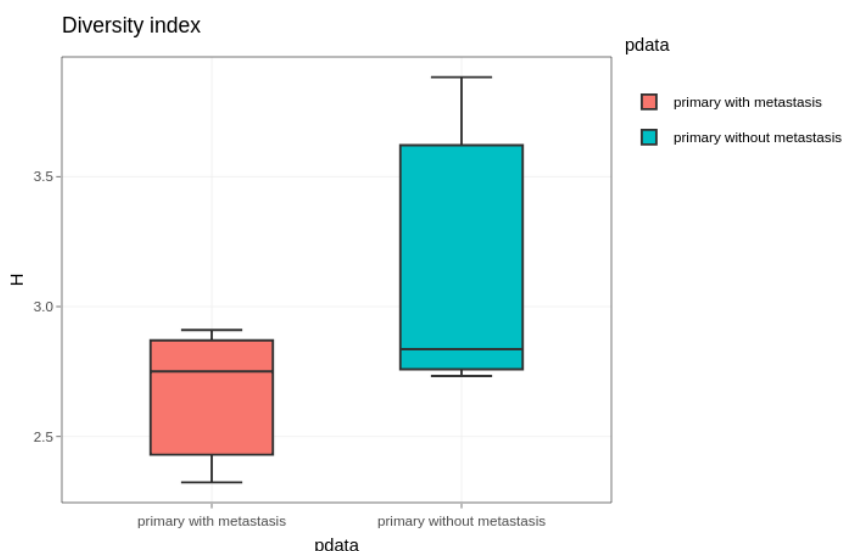
TaxID	Rank	Primary without metastasis counts	Primary with metastasis counts	FDR
Escherichia sp. 4_1_40B	Species	1746	7	0
Streptococcus pseudopneumoniae ATCC BAA-960 = CCUG 49455	Strain	122	0	7.7956e-07
Bifidobacterium adolescentis L2-32	Strain	92	0	7.7956e-07
Bacteroides fragilis CL03T00C08	Strain	70	0	7.7956e-07
Bifidobacterium sp. MSTE12	Strain	70	0	7.7956e-07
Streptococcus sp. HMSC076H10	Species	69	0	7.7956e-07
Oxalobacter formigenes OXCC13	Strain	56	0	7.7956e-07
Escherichia sp. 1_1_43	Species	144	0	9.7812e-07
Escherichia coli 113290	Strain	1186	0	9.8022e-07
Escherichia coli 110957	Strain	4	378	0.0006
Escherichia coli	Species	89	4	0.0092
Myroides odoratimimus CCUG 12700	Strain	66	1	0.0216
Lachnospiraceae bacterium 7_1_58FAA	Species	974	23	0.0446
Flavonifractor plautii 1_3_50AFAA	Strain	362	5	0.0461

Εξετάζοντας τη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί σε πειράματα ποντικών πως κάποια στελέχη του *Escherichia coli* (διαφορετικά από τα στελέχη του Πίνακα 5) που παράγουν colibactin δύναται να δημιουργήσουν τοξικό περιβάλλον στον ιστό του εντέρου. Τα στελέχη αυτά, σε συνεργασία με κάποιον άλλον εντεροτοξικό παράγοντα, όπως αυτός που παράγεται από το βακτήριο *Bacteroides fragilis*, συμβάλλουν στη δημιουργία φλεγμονής και κατά συνέπεια επιθετικών μορφών όγκων, κατάλληλων για μετάσταση. [83][84] Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η

εισαγωγή DNA από *Escherichia coli* και από *Helicobacter pylori* σε κυτταρικές σειρές οισοφάγου (OE33), γαστρικού σωλήνα (AGS) και παχέος εντέρου (CaCo-2) κάνει τα καρκινικά κύτταρα πιο διεισδυτικά. [90] Σε άλλη μελέτη, ο *Bacteroides fragilis* έχει παρατηρηθεί ότι μέσω της Polysaccharide A (PSA) στις κυτταρικές σειρές από καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου SW620 και HT29 διεγείρει την παραγωγή της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-8. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων και εμποδίζεται η πιθανή μετάστασή τους. [91] Τέλος, η χορήγηση του μικροοργανισμού *Flavonifractor plautii* έχει βρεθεί πως καταστέλλει τη φλεγμονή σε λιπώδη ιστό ποντικών και στην κυτταρική σειρά ποντικού RAW 264.7 (παρόμοια με μακροφάγα κύτταρα) [92], ενώ σε άλλη μελέτη έχει δειχθεί να καταστέλλει την IL-4 σε κύτταρα του σπλήνα και στο σάλιο από OVA-sensitized μοντέλα ποντικών. [93]



Εικόνα 12. Βoxplots μικροοργανισμών που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικοί στο dataset 2, primary with metastasis vs primary without metastasis



Εικόνα 13. Shannon index για το Dataset 2, primary with metastasis vs primary without metastasis

Στην **Εικόνα 13** διακρίνονται οι Shannon index για τη σύγκριση μεταξύ των primary with metastasis και primary without metastasis του dataset 2. Παρατηρούμε ότι η ποικιλομορφία του μικροβιακού πληθυσμού στο primary without metastasis είναι αυξημένη συγκριτικά με την ποικιλομορφία του primary with metastasis.

Στη συνέχεια της ανάλυσης εξετάστηκε το κάθε dataset με το πακέτο edgeR. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα έδειξε μόνο το dataset 3. (**Πίνακας 6**)

Πίνακας 6. Αποτελέσματα edgeR για το dataset 3

TaxID	Rank	Adjacent counts	Metastatic counts	FDR_aVSm	Adjacent counts	Primary counts	FDR_aVSp
Clostridium leptum DSM 753	Strain	52	1	0.0003	61	49	0.0012
Faecalibacterium cf. prausnitzii KLE1255	Strain	86	4	0.0003	97	2	0.0011
Massilia timonae CCUG 45783	Strain	70	28	0.0017	64	42	0.0078
Haemophilus sp. HMSC61B11	Species	72	14	0.0003	54	24	0.0013

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μικροοργανισμός *Clostridium leptum* δρα ως αντικαρκινικός παράγοντας και κατά της φλεγμονής σε ποντίκια και ανθρώπους με φλεγμονώδη νόσο του παχέος εντέρου.[94], [95]

Τέλος, αφού μελετήθηκε το κάθε ένα από τα τρία dataset ξεχωριστά, επόμενος στόχος ήταν να γίνει ένωση όλων των samples από όλα τα datasets σε κάθε μία από τις καταστάσεις adjacent, primary και metastatic. Δεδομένου ότι κάθε dataset προέρχεται από διαφορετικές μελέτες, έπρεπε στο πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση αυτή να δοθεί η πληροφορία της διαφορετικής πειραματικής προέλευσης, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση του φαινομένου του batch effect (διαφορετικές συνθήκες κατά την διεξαγωγή του πειράματος και της αλληλούχισης που μπορεί να μεταβάλουν μεροληπτικά τις τιμές έκφρασης των reads). Μετά την ένωση όλων των δειγμάτων, η κάθε μία από τις τρεις καταστάσεις περιείχε 24 δείγματα. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης έγινε τροποποίηση του αλγορίθμου AGAMEMNON για το πακέτο edgeR, με σκοπό να λαμβάνει υπόψη το batch effect. Η χρήση του πακέτου metagenomeSeq δεν ήταν εφικτή, λόγω αδυναμίας εισαγωγής του παράγοντα αυτού στην σύγκριση των τριών κατηγοριών.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα του edgeR μετά την ένωση των δειγμάτων

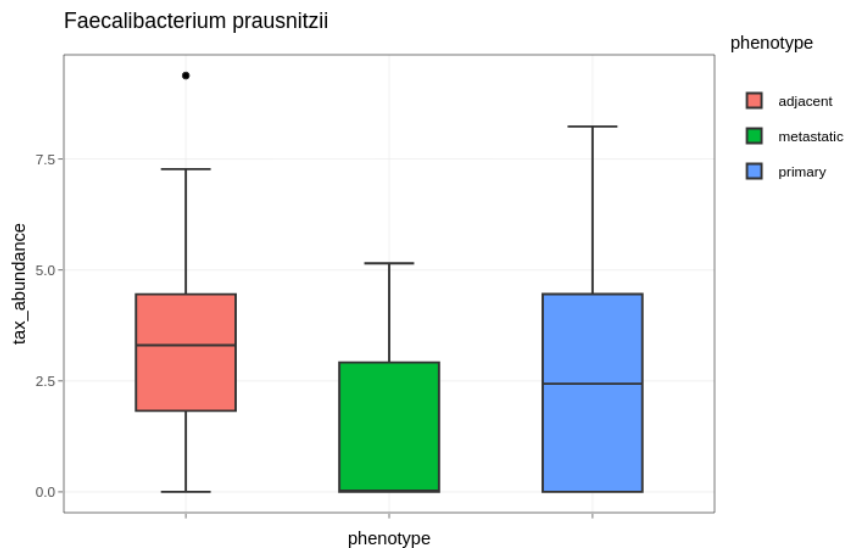
TaxID	Rank	Adjacent counts	Metastatic counts	FDR_aVSm	Adjacent counts	Primary counts	FDR_aVSp
Staphylococcus hominis subsp. hominis C80	Strain	138	26	0.0081	281	2	0.0109
Clostridioides difficile NAP08	Strain	51	1	0.0050	122	39	0.0053
Corynebacterium glucuronolyticum ATCC 51866	Strain	170	5	0.0236	94	15	0.0485
Corynebacterium matruchotii ATCC 33806	Strain	332	11	0.0047	717	15	0.0046
Lactobacillus reuteri MM2-3	Strain	65	2	0.0082	73	2	0.0112
Treponema vincentii ATCC 35580	Strain	77	20	0.0196	57	29	0.0394
Porphyromonas uenonis 60-3	Strain	6483	51	0.0193	853	163	0.0374
Lachnospiraceae bacterium 6_1_37FAA	Species	155	3	0.0059	118	3	0.0066

Erysipelotrichaceae bacterium 21_3	Species	58	2	0.0059	212	1	0.0068
Faecalibacterium cf. prausnitzii KLE1255	Strain	93	3	0.0025	1574	24	0.0025
Enterococcus faecalis TX0470	Strain	4819	17	0.0100	1779	109	0.0136
Enterococcus faecalis TX0855	Strain	203	22	0.0218	175	16	0.0447
Enterococcus faecalis TX0860	Strain	1195	48	0.0216	850	12	0.0428
Enterococcus faecalis TX1341	Strain	2428	28	0.0211	2406	31	0.0417
Enterococcus faecalis TX1342	Strain	391	2	0.0215	278	2	0.0423
Enterococcus faecalis TX1346	Strain	14134	253	0.0210	13139	292	0.0412
Enterococcus faecalis TX1467	Strain	371	4	0.0210	264	10	0.0413
Kingella denitrificans ATCC 33394	Strain	79	64	0.0009	210	139	0.0008
Streptococcus peroris ATCC 700780	Strain	105	2	0.0009	197	2	0.0008
Bacteroides salyersiae WAL 10018 = DSM 18765 = JCM 12988	Strain	186	5	0.0110	137	5	0.0407
Bifidobacterium longum subsp. longum 44B	Strain	66	1	0.0056	31	55	0.0010
Olsenella uli MSTE5	Strain	46713	5203	0.0356	38870	17429	0.0356
Mageeibacillus indolicus 0009-5	Strain	78	9	0.0009	1470	17	0.0009
Tissierellia bacterium S7-1-4	Species	124	2	0.0007	212	9	0.0009
Prevotella bivia DNF00650	Strain	1119	3	0.0059	4006	3	0.0060
Prevotella melaninogenica DNF00666	Strain	99	266	0.0059	103	272	0.0062
Prevotella buccalis DNF00985	Strain	462	13	0.0050	852	7	0.0056

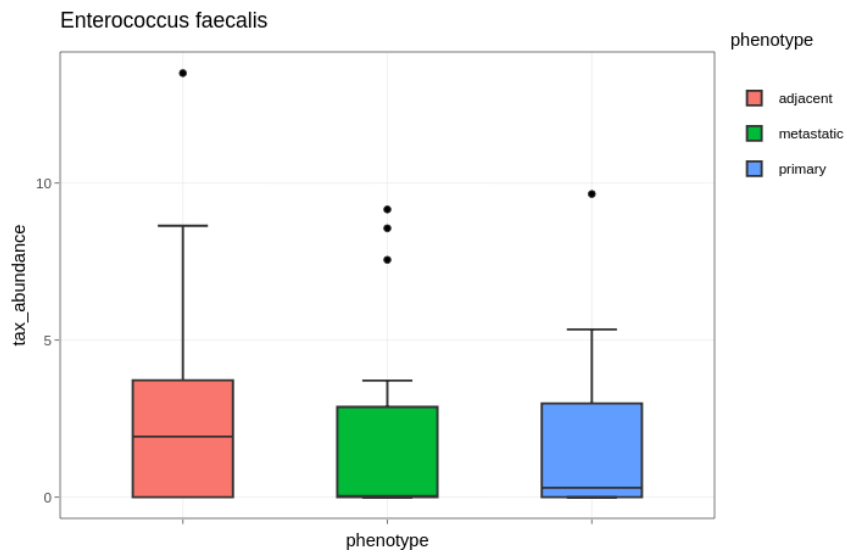
Actinomyces sp. HMSC08A09	Species	25	187	0.0068	77	183	0.0085
Trueperella sp. HMSC08B05	Species	274	28	0.0070	785	5	0.0109
Enterococcus sp. HMSC073E09	Species	109	8	0.0061	78	1	0.0075
Staphylococcus sp. HMSC078E07	Species	562	1	0.0059	1360	2	0.0068

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 7**, από τον μικροοργανισμό *Enterococcus faecalis* βρέθηκαν 7 στελέχη, και πιο συγκεκριμένα 6 από αυτά εντοπίστηκαν να είναι αυξημένα στη κατάσταση adjacent, ενώ 1 από τα 7 βρέθηκε αυξημένο στις καταστάσεις με καρκίνο. Ο ρόλος του συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι ακόμα αμφιλεγόμενος. Ενώ πολλές φορές χρησιμοποιείται ως προβιοτικό και δείχνει να έχει αντιφλεγμονώδη δράση, άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι είναι ικανός να προκαλέσει βλάβη στο DNA των επιθηλιακών κυττάρων (μετάλλαξη) και κατά επέκταση στον επιθηλιακό φραγμό (παχέος εντέρου), με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκίνου και πιθανής μετάστασης. [96] (**εικόνες 14-16**)

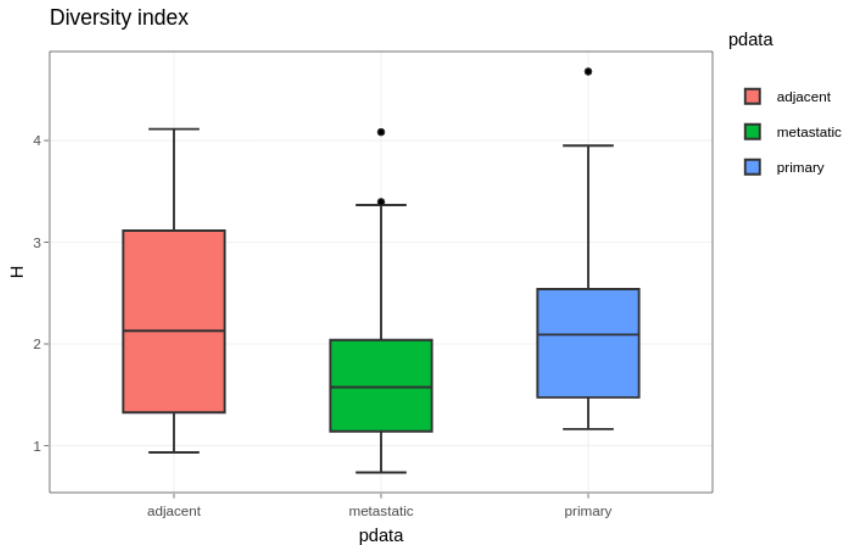
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση της ένωσης όλων των datasets και του dataset 3 χρησιμοποιώντας το edgeR, βρέθηκε ότι μόνο ο μικροοργανισμός *Faecalibacterium prausnitzii* είναι κοινός μεταξύ των στατιστικά σημαντικών ευρημάτων. Σε όλες τις συγκρίσεις, ο μικροοργανισμός φαίνεται να είναι αυξημένος στην κατάσταση adjacent, ενώ αντιθέτως εντοπίζεται μειωμένος στις καταστάσεις primary και metastasis. Απουσία του μικροοργανισμού *Faecalibacterium prausnitzii*, όπως εντοπίζεται στη σχετική βιβλιογραφία, συσχετίζεται με τη δημιουργία φλεγμονής και, κατά επέκταση, καρκίνου. [90][91] (**εικόνες 17-18**)



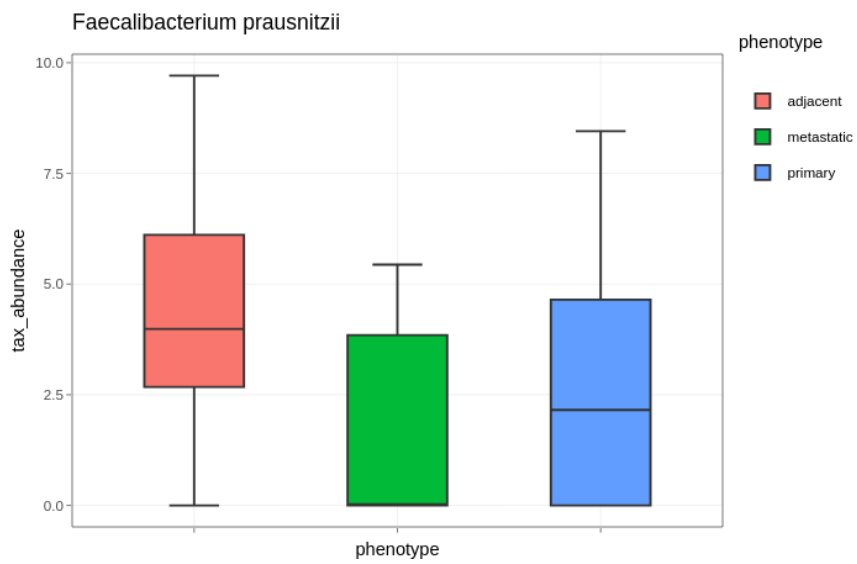
Εικόνα 14. *Faecalibacterium prausnitzii*, μετά την ένωση όλων των datasets



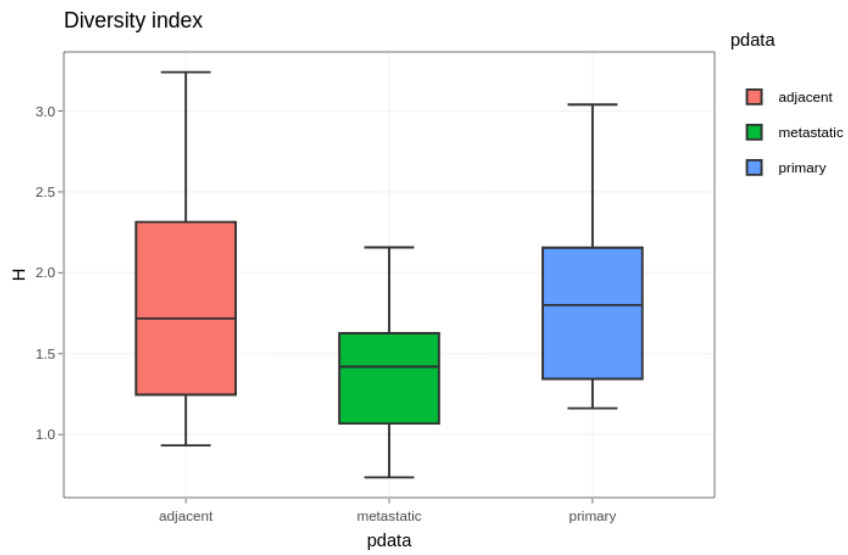
Εικόνα 15. *Enterococcus faecalis*, μετά την ένωση όλων των datasets



Εικόνα 16. Shannon index, μετά την ένωση όλων των datasets



Εικόνα 17. Faecalibacterium prausnitzii στο dataset 3



Εικόνα 18. Shannon index για το dataset 3

4. Συμπεράσματα

Στη παρούσα διπλωματική εργασία έγινε διερεύνηση του μικροβιώματος σε ανθρώπινα δείγματα καρκινικού ιστού με μετάσταση. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από τη βάση δεδομένων NCBI GEO. Συνολικά αναλύθηκαν 75 δείγματα, τα οποία περιείχαν τρεις διαφορετικές καταστάσεις ιστού: δείγμα από το όργανο της ογκογένεσης (primary tumor tissue), δείγμα από περιοχή του ίδιου οργάνου χωρίς να έχει αποικιστεί από καρκινικά κύτταρα (adjacent normal tissue) και δείγμα από το όργανο που έγινε η μετάσταση (metastatic tissue). Το πρώτο dataset περιείχε τρεις ασθενείς με καρκίνο της χοληδόχου κύστεως και μετάσταση στο ήπαρ (σύνολο 9 δείγματα). Το δεύτερο dataset περιείχε τρεις ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και μετάσταση στο ήπαρ (σύνολο 9 δείγματα). Το ίδιο dataset περιείχε τρεις ακόμη ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί μετάσταση (επιπλέον 3 δείγματα, primary tissue without metastasis). Τέλος, το τρίτο dataset περιείχε δεκαοχτώ ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου και μετάσταση στο ήπαρ (σύνολο 54 δείγματα). Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης ανάλυσης έγινε χρήση των αλγορίθμων HISAT2 και AGAMEMNON.

Με τη χρήση του πακέτου στατιστικής ανάλυσης metagenomeSeq μέσω της διεπαφής του AGAMEMNON, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για το dataset 1 και για το dataset 2 (primary tissue with metastasis vs primary tissue without metastasis). Συγκεκριμένα, για το dataset 1 έγιναν οι συγκρίσεις adjacent vs primary, adjacent vs metastatic και metastasis vs primary. Πραγματοποιήθηκε μελέτη στη βιβλιογραφία για τους 9 μικροοργανισμούς που βρέθηκαν να είναι κοινói στις συγκρίσεις adjacent vs primary και adjacent vs metastatic με στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ ταυτόχρονα δεν βρέθηκαν να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στη σύγκριση metastasis vs primary. Για τη μετάσταση της χοληδόχου κύστεως στο ήπαρ δεν βρέθηκαν συσχετισμένοι μικροοργανισμοί στη βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί πως το γένος *Veillonella* δρα προστατευτικά στο καρκίνο ουροδόχου κύστης και πως οι μικροοργανισμοί *Abitrophia* και *Oscillibacter* είναι αυξημένοι σε ασθενείς που πάσχουν από φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Με αυτά τα δεδομένα, μπορεί να διατυπωθεί η υπόθεση πως το γένος *Veillonella* δρα προστατευτικά στη χοληδόχο κύστη, ενώ οι άλλοι δύο μικροοργανισμοί συνεργούν στη φλεγμονώδη κατάσταση η οποία μπορεί να οδηγήσει στην ογκογένεση. Συμπερασματικά, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τους εννέα μικροοργανισμούς, ώστε να μελετηθεί η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης με μετάσταση και τα μονοπάτια μέσω των οποίων επιτελείται η διαδικασία.

Στο dataset 2, στη σύγκριση primary without metastasis vs primary with metastasis, βρέθηκαν δεκατέσσερις κοινói μικροοργανισμοί, δεκατρείς εκ των οποίων εντοπίστηκαν να εκφράζονται στη κατάσταση primary without metastasis. Ενδιαφέρον εύρημα στη βιβλιογραφία αποτελεί ο *Bacteroides fragilis*,

όπου έχει παρατηρηθεί ότι μέσω της Polysaccharide A (PSA) στις κυτταρικές σειρές από καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου SW620 και HT29 διεγείρεται η παραγωγή της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-8. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων και εμποδίζεται η πιθανή μετάσταση τους. Τέλος, η χορήγηση του μικροοργανισμού *Flavonifractor plautii* έχει βρεθεί πως καταστέλλει τη φλεγμονή σε λιπώδη ιστό ποντικών. Συμπερασματικά και με βάση την βιβλιογραφία, μπορεί να υποτεθεί πως αυτοί οι δύο μικροοργανισμοί δρουν προστατευτικά για την αποφυγή πιθανής μετάστασης.

Με τη χρήση του πακέτου στατιστικής ανάλυσης edgeR, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για το dataset 3, καθώς και στην ανάλυση μετά την ένωση όλων των δειγμάτων ως ένα συνολικό dataset. Στα αποτελέσματα ανάλυσης για όλα τα δείγματα βρέθηκαν επτά strain του μικροοργανισμού *Enterococcus faecalis* και συγκεκριμένα έξι από αυτά βρέθηκαν να είναι αυξημένα στη κατάσταση adjacent, ενώ ένα παρατηρήθηκε να είναι αυξημένο στις καταστάσεις με καρκίνο. Ο ρόλος του συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι ακόμα αμφιλεγόμενος. Ενώ πολλές φορές χρησιμοποιείται ως προβιοτικό και έχει αντιφλεγμονώδη δράση, άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι είναι ικανός να προκαλέσει βλάβη στο DNA των επιθηλιακών κυττάρων (μετάλλαξη) και κατά επέκταση στον επιθηλιακό φραγμό (παχέος εντέρου) με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκίνου και πιθανής μετάστασης. Τέλος, μεταξύ του dataset 3 και την ένωση όλων των dataset βρέθηκε η κοινή ύπαρξη του μικροοργανισμού *Faecalibacterium prausnitzii*, όπου φαίνεται να είναι αυξημένος στη κατάσταση adjacent, ενώ αντιθέτως εντοπίζεται μειωμένος στις καταστάσεις primary και metastasis. Απουσία του μικροοργανισμού *Faecalibacterium prausnitzii*, όπως συμπεραίνεται από τη βιβλιογραφία, συσχετίζεται με τη δημιουργία φλεγμονής και κατά επέκταση καρκίνου, ενώ δεν εντοπίστηκαν αναφορές που να τον συσχετίζουν με μετάσταση.

Ο μικροοργανισμός *Bacteroides fragilis* είδαμε στην εισαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μπορεί να εκκρίνει μία τοξίνη η οποία είναι ικανή να διασπάσει την E-Cadherin. Με την σειρά του αυτό μπορεί να προκαλέσει έκφραση της N-cadherin, η οποία αυξάνει την κινητικότητα των κυττάρων, επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να αποκολληθούν από το επιθηλιακό στρώμα. Από την άλλη ο *Bacteroides fragilis* μπορεί να διεγείρει την IL-8 και να κατευνάζει τη φλεγμονή.

Δεδομένου αυτού του παραδείγματος και λαμβάνοντας υπόψη ότι το μικροβίωμα αλλάζει από άνθρωπο σε άνθρωπο, είναι πολύ πιθανό ένας μικροοργανισμός να έχει διαφορετική δράση ανάλογα με το περιβάλλον που αποικεί. Εξαιτίας αυτού, ίσως να ήταν αποδοτικότερο οι μελέτες να επικεντρώνονται σε δίκτυα μικροοργανισμών για να εξάγονται συμπεράσματα για ενδεχόμενες συνεργατικές δράσεις.

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για τη συγκεκριμένη μελέτη, δεν είχαν σχεδιαστεί για την ανάλυση μεταγονιδιωματικής.. Με αυτό το τρόπο είναι πιθανό τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν να έχουν υποστεί επιπολασμό κατά τη λήψη των δειγμάτων και κατά επέκταση να έχουν δώσει ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ακόμα, εξαιτίας της έλλειψης ειδικότητας στις τεχνικές δειγματοληψίας και αλληλούχησης, είναι πιθανό να έχει χαθεί σημαντικό ποσό πληροφορίας.

Ως μελλοντική ερευνητική εργασία που θα επεκτείνει την παρούσα μελέτη προτείνεται η ανάλυση των στατιστικά σημαντικών μικροοργανισμών και των γονιδιωμάτων τους, ώστε να εντοπιστεί και να ποσοτικοποιηθεί η γονιδιακή τους έκφραση τη στιγμή της δειγματοληψίας των ιστών. Η διερεύνηση, στη βιβλιογραφία, της λειτουργίας αυτών των γονιδίων θα μπορούσε να οδηγήσει στη διεξαγωγή συμπερασμάτων για τον ρόλο των συγκεκριμένων μικροοργανισμών και την αποκάλυψη ρυθμιστικών μονοπατιών και λειτουργιών που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με της καρκινικές διαδικασίες της ογκογένεσης και της μετάστασης. Επιπλέον, η ανάλυση δειγμάτων που εξ 'αρχής έχουν σχεδιαστεί για μεταγονιδιωματική ανάλυση (shotgun metagenomics, 16S rRNA-seq), αλλά και η συλλογή περισσότερων δειγμάτων, θα αυξήσουν τη στατιστική δύναμη της μελέτης και θα επιτρέψουν την ειδικότερη και εγκυρότερη ανάλυση των διαφορετικά εκφρασμένων μικροβιακών οργανισμών, την διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων, καθώς και τον εντοπισμό ακόμη και των ασθενέστερων, όμως πιθανά εξίσου σημαντικών σχετικών με το φαινόμενο μηχανισμών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
RNA-seq	αλληλούχιση ριβονουκλεϊκού οξέος
adjacent tissue	φυσιολογικός ιστός δίπλα από καρκινικό
primary tissue	πρωτεύοντας καρκινικός ιστός που προηγείται της μετάστασης
metastatic tissue	μεταστατικός καρκινικός ιστός
gut-liver axis	συνδέση ήπατος με το γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της πυλαίας φλέβας
Next Generation Sequencing	αλληλούχιση επόμενης γενιάς
in vitro	πείραμα που διεξάγεται χωρίς ζωικό μοντέλο
Human Genome Project	πρόγραμμα αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος
fragments	τμήμα
read	κομμάτι που προέρχεται από DNA ή RNA
base pair	ζεύγος νουκλεϊκών βάσεων
genomic	γονιδιωματικός
metagenomic	μεταγονιδιωματικός
high-throughput technologies	τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης
multiomics	συνδυασμός πεδίων «-omic» όπως πρωτεομική, γονιδιωματική, μεταγονιδιωματική κ.ά.
portal	ιστοσελίδα που χρησιμοποιείται ως διεπαφή αναζήτησης και απόκτησης πληροφοριών
cancer	καρκίνος
dataset	σύνολο δεδομένων
paired-end	ζευγάρι αλληλουχιών που προέρχεται από την αλληλούχιση ενός read και από τις 2 πλευρές του με αντίστροφη πορεία
gallbladder	χοληδόχος κύστη
colorectal	εντερικός
liver	συκώτι
quality	ποιότητα
score	βαθμολογία
orphan read	paired-end αλληλουχίες που χάθηκε το ζευγάρι τους κατά τη διαδικασία της προ-επεξεργασίας
mate	ζευγάρι αλληλουχίας που έχει προκύψει από paired-end αλληλούχιση
pre-processing	προ-επεξεργασία

index	δείκτης
splicesites	περιοχή ματίσματος ενός μεταγράφου
reference genome	γονιδίωμα αναφοράς
output	έξοδος
suffix array	πίνακας που περιέχει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μιας αλληλουχίας
contamination	επιπολασμός
script	σύντομο πρόγραμμα που συνήθως εκτελεί διαδικασίες περιορισμένου μεγέθους
text	κείμενο
count	μέτρηση
differential abundance	διαφορετική ποσότητα έκφρασης ενός γονιδίου
boxplot	θηκόγραμμα
median	διάμεσος
sensitized	ευπαθής
batch effect	φαινόμενο κατά το οποίο οι συνθήκες διεξαγωγής ενός πειράματος επηρεάζουν μεροληπτικά τα αποτελέσματα
with	με
without	χωρίς

ΣΥΝΓΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΑ

NCBI	National Center for Biotechnology Information
GEO	Gene Expression Omnibus
HISAT2	Hierarchical Indexing For Spliced Alignment of Transcripts 2
HMP	Human Microbiome Project
DNA	δεσοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ
nm	νανόμετρα
RNA	ριβοζονουκλεϊκό οξύ
mL	χιλιοστόλιτρα
LAB	βακτήρια γαλακτικού οξέος
MetaHIT	Metagenomics of the Human Intestinal Tract
sp.	species
SCFA	μικρή αλυσίδα λιπαρών οξέων
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
GF	στείρο μικροβίων
EHEC	<i>Enterohemorrhagic Escherichia Coli</i>
IBD	φλεγμονώδης νόσος του εντέρου
ASD	Διαταραχές Αυτιστικού Φάσματος
HPV	ίος των ανθρώπινων θηλωμάτων
HIV	ίος της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
AIDS	σύνδρομο επίκτητης ανοσοεπάρκειας
CRC	καρκίνος του παχέος εντέρου
CLD	χρόνια ηπατική νόσος
ddNTPS	διδέοξυ-νουκλεοτίδια
bp	ζευγάρι νουκλεοτιδικών βάσεων
rRNA	ριβοσωμικό ριβοζονουκλεϊκό οξύ
DDC	Data Coordination Center
SRA	Sequence Read Archive
dbGaP	Database of Genotypes and Phenotypes
iHMP	Integrative Human Microbiome Project
FM-index	Feragina Manzini index
vs	έναντι
FDR	False Discovery Rate
AFP	α-Φετοπρωτεΐνη
PSA	πολυσακχαρίτης A
IL-8	ιντερλευκίνη-8
IL-4	ιντερλευκίνη-4
OVA-sensitized	ευπάθεια οβαλβουμίνης

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] N. C. for B. Information, U. S. N. L. of M. 8600 R. Pike, B. MD, and 20894 Usa, *What are microbes?* Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG), 2019.
- [2] E. Berthold, “What are archaea?,” *Curious*, Aug. 13, 2018.
<https://www.science.org.au/curious/earth-environment/what-are-archaea> (accessed Aug. 17, 2020).
- [3] M. Society, “Archaea | What is microbiology?” <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/archaea.html> (accessed Aug. 17, 2020).
- [4] J. A. Gilbert, M. J. Blaser, J. G. Caporaso, J. K. Jansson, S. V. Lynch, and R. Knight, “Current understanding of the human microbiome,” *Nat. Med.*, vol. 24, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2018, doi: 10.1038/nm.4517.
- [5] A. B. Shreiner, J. Y. Kao, and V. B. Young, “The gut microbiome in health and in disease,” *Curr. Opin. Gastroenterol.*, vol. 31, no. 1, pp. 69–75, Jan. 2015, doi: 10.1097/MOG.000000000000139.
- [6] “Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body.” <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002533> (accessed Jul. 14, 2020).
- [7] “REED - Revista Española de Enfermedades Digestivas.” <https://www.reed.es/ArticuloFicha.aspx?id=2532&hst=0&idR=56&tp=1> (accessed Jul. 10, 2020).
- [8] P. C. Barko, M. A. McMichael, K. S. Swanson, and D. A. Williams, “The Gastrointestinal Microbiome: A Review,” *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 32, no. 1, pp. 9–25, 2018, doi: 10.1111/jvim.14875.
- [9] L. A. Lai, Z. Tong, R. Chen, and S. Pan, “Metaproteomics Study of the Gut Microbiome,” in *Functional Proteomics: Methods and Protocols*, X. Wang and M. Kuruc, Eds. New York, NY: Springer, 2019, pp. 123–132.
- [10] “The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians | The BMJ.” <https://www.bmj.com/content/356/bmj.j831.long> (accessed Jul. 11, 2020).
- [11] S. Macfarlane and G. T. Macfarlane, “Regulation of short-chain fatty acid production,” *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 62, no. 1, pp. 67–72, Feb. 2003, doi: 10.1079/PNS2002207.
- [12] R. B. Sartor, “Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases,” *Gastroenterology*, vol. 134, no. 2, pp. 577–594, Feb. 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059.
- [13] J. G. LeBlanc, C. Milani, G. S. de Giori, F. Sesma, D. van Sinderen, and M. Ventura, “Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 24, no. 2, pp. 160–168, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.copbio.2012.08.005.
- [14] H. K. Biesalski, “Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1372, no. 1, pp. 53–64, 2016, doi: 10.1111/nyas.13145.
- [15] N. Shi, N. Li, X. Duan, and H. Niu, “Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system,” *Mil. Med. Res.*, vol. 4, no. 1, p. 14, Apr. 2017, doi: 10.1186/s40779-017-0122-9.
- [16] H. Chung *et al.*, “Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota,” *Cell*, vol. 149, no. 7, pp. 1578–1593, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.037.
- [17] I. Gantois *et al.*, “Butyrate Specifically Down-Regulates Salmonella Pathogenicity Island 1 Gene Expression,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 946–949, Jan. 2006, doi: 10.1128/AEM.72.1.946-949.2006.
- [18] S. Kommineni *et al.*, “Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract,” *Nature*, vol. 526, no. 7575, Art. no. 7575, Oct. 2015, doi: 10.1038/nature15524.
- [19] “Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 | Microbiology Society.”

- <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-51-3-201#tab2> (accessed Jul. 24, 2020).
- [20] S. V. Lynch and O. Pedersen, "The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease," <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>, Dec. 14, 2016. https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1600266?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed (accessed Jul. 24, 2020).
- [21] J. McIlroy, G. Ianiro, I. Mukhopadhyaya, R. Hansen, and G. L. Hold, "Review article: the gut microbiome in inflammatory bowel disease—avenues for microbial management," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 47, no. 1, pp. 26–42, 2018, doi: 10.1111/apt.14384.
- [22] E. A. Franzosa *et al.*, "Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease," *Nat. Microbiol.*, vol. 4, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41564-018-0306-4.
- [23] J. Halfvarson *et al.*, "Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease," *Nat. Microbiol.*, vol. 2, no. 5, Art. no. 5, Feb. 2017, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.4.
- [24] Y.-J. Zhang, S. Li, R.-Y. Gan, T. Zhou, D.-P. Xu, and H.-B. Li, "Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, Art. no. 4, Apr. 2015, doi: 10.3390/ijms16047493.
- [25] J. Pulikkan, A. Mazumder, and T. Grace, "Role of the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorders," in *Reviews on Biomarker Studies in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders*, P. C. Guest, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 253–269.
- [26] H. M. Parracho, M. O. Bingham, G. R. Gibson, and A. L. McCartney, "Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children," *J. Med. Microbiol.*, vol. 54, no. 10, pp. 987–991, Oct. 2005, doi: 10.1099/jmm.0.46101-0.
- [27] G. Fowlie, N. Cohen, and X. Ming, "The Perturbance of Microbiome and Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2018, doi: 10.3390/ijms19082251.
- [28] A. Tripathi *et al.*, "The gut–liver axis and the intersection with the microbiome," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 15, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41575-018-0011-z.
- [29] P. C. Konturek *et al.*, "Gut–Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver?," *Med. Sci.*, vol. 6, no. 3, Art. no. 3, Sep. 2018, doi: 10.3390/medsci6030079.
- [30] A. Albillos, A. de Gottardi, and M. Rescigno, "The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy," *J. Hepatol.*, vol. 72, no. 3, pp. 558–577, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jhep.2019.10.003.
- [31] H. Tilg, P. D. Cani, and E. A. Mayer, "Gut microbiome and liver diseases," *Gut*, vol. 65, no. 12, pp. 2035–2044, Dec. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312729.
- [32] R. Francescone, V. Hou, and S. I. Grivennikov, "Microbiome, Inflammation, and Cancer," *Cancer J.*, vol. 20, no. 3, pp. 181–189, Jun. 2014, doi: 10.1097/PPO.0000000000000048.
- [33] "The Human Microbiome and Cancer | Cancer Prevention Research." <https://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/content/10/4/226.long> (accessed Jul. 28, 2020).
- [34] E. Saus, S. Iraola-Guzmán, J. R. Willis, A. Brunet-Vega, and T. Gabaldón, "Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential," *Mol. Aspects Med.*, vol. 69, pp. 93–106, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.mam.2019.05.001.
- [35] "The microbiome, cancer, and cancer therapy | Nature Medicine." <https://www.nature.com/articles/s41591-019-0377-7> (accessed Jul. 28, 2020).

- [36] L. E. Wroblewski and R. M. Peek, "Helicobacter pylori, Cancer, and the Gastric Microbiota," in *Stem Cells, Pre-neoplasia, and Early Cancer of the Upper Gastrointestinal Tract*, M. Jansen and N. A. Wright, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 393–408.
- [37] M. Ringehan, J. A. McKeating, and U. Protzer, "Viral hepatitis and liver cancer," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 372, no. 1732, p. 20160274, Oct. 2017, doi: 10.1098/rstb.2016.0274.
- [38] Y. Ji and H. Lu, "Malignancies in HIV-Infected and AIDS Patients," in *Infectious Agents Associated Cancers: Epidemiology and Molecular Biology*, Q. Cai, Z. Yuan, and K. Lan, Eds. Singapore: Springer, 2017, pp. 167–179.
- [39] "A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer," *Cancer Network*. <https://www.cancernetwork.com/view/contemporary-review-hpv-and-penile-cancer> (accessed Jul. 28, 2020).
- [40] H. Brody, "Colorectal cancer," *Nature*, vol. 521, no. 7551, Art. no. 7551, May 2015, doi: 10.1038/52151a.
- [41] H. Tilg, T. E. Adolph, R. R. Gerner, and A. R. Moschen, "The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer," *Cancer Cell*, vol. 33, no. 6, pp. 954–964, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.004.
- [42] B. Jia and C. O. Jeon, "Promotion and induction of liver cancer by gut microbiome-mediated modulation of bile acids," *PLOS Pathog.*, vol. 15, no. 9, p. e1007954, 2019, doi: 10.1371/journal.ppat.1007954.
- [43] N. Ohtani and N. Kawada, "Role of the Gut–Liver Axis in Liver Inflammation, Fibrosis, and Cancer: A Special Focus on the Gut Microbiota Relationship," *Hepatol. Commun.*, vol. 3, no. 4, pp. 456–470, 2019, doi: 10.1002/hep4.1331.
- [44] P. Rattan, C. D. Minacapelli, and V. Rustgi, "The Microbiome and Hepatocellular Carcinoma," *Liver Transpl.*, vol. n/a, no. n/a, doi: 10.1002/lt.25828.
- [45] W. Jia, G. Xie, and W. Jia, "Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 15, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrgastro.2017.119.
- [46] H. Lee, H. K. Lee, S. K. Min, and W. H. Lee, "16S rDNA microbiome composition pattern analysis as a diagnostic biomarker for biliary tract cancer," *World J. Surg. Oncol.*, vol. 18, no. 1, p. 19, Jan. 2020, doi: 10.1186/s12957-020-1793-3.
- [47] I. N. Grigor'eva and T. I. Romanova, "Gallstone Disease and Microbiome," *Microorganisms*, vol. 8, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8060835.
- [48] N. Keren *et al.*, "Interactions between the intestinal microbiota and bile acids in gallstones patients," *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 7, no. 6, pp. 874–880, 2015, doi: 10.1111/1758-2229.12319.
- [49] X. Song *et al.*, "A metagenomic study of biliary microbiome change along the cholecystitis-carcinoma sequence," *Clin. Transl. Med.*, vol. 10, no. 2, p. e97, 2020, doi: 10.1002/ctm2.97.
- [50] "The influence of the gastrointestinal microbiome on colorectal metastasis: a narrative review - Stakelum - - Colorectal Disease - Wiley Online Library." <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/codi.14930> (accessed Aug. 06, 2020).
- [51] "Ten years of next-generation sequencing technology: Trends in Genetics." [https://www.cell.com/trends/genetics/fulltext/S0168-9525\(14\)00112-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0168952514001127%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/genetics/fulltext/S0168-9525(14)00112-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0168952514001127%3Fshowall%3Dtrue) (accessed Aug. 07, 2020).
- [52] F. Sanger and A. R. Coulson, "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase," *J. Mol. Biol.*, vol. 94, no. 3, pp. 441–448, May 1975, doi: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.

- [53] F. Sanger *et al.*, “Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA,” *Nature*, vol. 265, no. 5596, Art. no. 5596, Feb. 1977, doi: 10.1038/265687a0.
- [54] J. A. Garrido-Cardenas and F. Manzano-Agugliaro, “The metagenomics worldwide research,” *Curr. Genet.*, vol. 63, no. 5, pp. 819–829, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00294-017-0693-8.
- [55] “Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity - ScienceBase-Catalog.”
<https://www.sciencebase.gov/catalog/item/5053cc30e4b097cd4fcf169a> (accessed Aug. 10, 2020).
- [56] K. P. Aßhauer, B. Wemheuer, R. Daniel, and P. Meinicke, “Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 17, pp. 2882–2884, Sep. 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv287.
- [57] “Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora | Science.”
<https://science.sciencemag.org/content/308/5728/1635/tab-article-info> (accessed Sep. 13, 2020).
- [58] S. R. Gill *et al.*, “Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome,” *Science*, vol. 312, no. 5778, pp. 1355–1359, Jun. 2006, doi: 10.1126/science.1124234.
- [59] E. K. Costello, C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon, and R. Knight, “Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time,” *Science*, vol. 326, no. 5960, pp. 1694–1697, Dec. 2009, doi: 10.1126/science.1177486.
- [60] “Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients | Science.” <https://science.sciencemag.org/content/359/6371/97> (accessed Sep. 13, 2020).
- [61] “The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients | Science.” <https://science.sciencemag.org/content/359/6371/104> (accessed Sep. 13, 2020).
- [62] “The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome.”
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001377> (accessed Sep. 13, 2020).
- [63] “The Human Microbiome Project | Nature.”
<https://www.nature.com/articles/nature06244> (accessed Sep. 13, 2020).
- [64] “The Integrative Human Microbiome Project | Nature.”
<https://www.nature.com/articles/s41586-019-1238-8> (accessed Sep. 13, 2020).
- [65] T. Barrett *et al.*, “NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. D1, pp. D991–D995, Jan. 2013, doi: 10.1093/nar/gks1193.
- [66] “The expression profiles of GBC liver metastasis (ID 546548) - BioProject - NCBI.”
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA546548> (accessed Sep. 18, 2020).
- [67] Y.-S. Ma *et al.*, “Proteogenomic characterization and comprehensive integrative genomic analysis of human colorectal cancer liver metastasis,” *Mol. Cancer*, vol. 17, no. 1, p. 139, Sep. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0890-1.
- [68] “A prognostic index based on an eleven gene signature to predict systemic recurrences in colorectal cancer | Experimental & Molecular Medicine.”
<https://www.nature.com/articles/s12276-019-0319-y> (accessed Sep. 18, 2020).
- [69] “SRA-Tools - NCBI.” <http://ncbi.github.io/sra-tools/?fbclid=IwAR03RukXQ9TCRI9dbYpkJSADug5lr-7XtqAd7qjORnQmXo-bzOhr8GOyyww> (accessed Aug. 12, 2020).
- [70] “Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.” <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed Aug. 12, 2020).

- [71] M. P. A. Davis, S. van Dongen, C. Abreu-Goodger, N. Bartonicek, and A. J. Enright, "Kraken: A set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data," *Methods*, vol. 63, no. 1, pp. 41–49, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ymeth.2013.06.027.
- [72] M. Martin, "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads," *EMBnet.journal*, vol. 17, no. 1, Art. no. 1, May 2011, doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- [73] E. Staton, *sestaton/Pairfq*. 2020.
- [74] D. Kim, J. M. Paggi, C. Park, C. Bennett, and S. L. Salzberg, "Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype," *Nat. Biotechnol.*, vol. 37, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
- [75] "Winston Chang, Joe Cheng, JJ Allaire, Yihui Xie and Jonathan McPherson (2020). shiny: Web Application Framework for R. R package version 1.5.0. <https://CRAN.R-project.org/package=shiny>."
- [76] "Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M (2013). 'Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys.' *Nat Meth*, advance online publication. doi: 10.1038/nmeth.2658, <http://www.nature.com/nmeth/journal/vaop/ncurrent/abs/nmeth.2658.html>."
- [77] "McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK (2012). 'Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation.' *Nucleic Acids Research*, 40(10), 4288-4297. doi: 10.1093/nar/gks042."
- [78] H. Bi *et al.*, "Urinary microbiota – a potential biomarker and therapeutic target for bladder cancer," *J. Med. Microbiol.*, vol. 68, no. 10, pp. 1471–1478, Oct. 2019, doi: 10.1099/jmm.0.001058.
- [79] J. Geng *et al.*, "Co-occurrence of driver and passenger bacteria in human colorectal cancer," *Gut Pathog.*, vol. 6, no. 1, p. 26, Jun. 2014, doi: 10.1186/1757-4749-6-26.
- [80] L. Zhang, Y.-N. Wu, T. Chen, C.-H. Ren, X. Li, and G.-X. Liu, "Relationship between intestinal microbial dysbiosis and primary liver cancer," *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, vol. 18, no. 2, pp. 149–157, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.hbpd.2019.01.002.
- [81] I. Masoodi *et al.*, "Microbial dysbiosis in inflammatory bowel diseases: results of a metagenomic study in Saudi Arabia," *Minerva Gastroenterol. Dietol.*, vol. 65, no. 3, Oct. 2019, doi: 10.23736/S1121-421X.19.02576-5.
- [82] M. F. Loke *et al.*, "Metabolomics and 16S rRNA sequencing of human colorectal cancers and adjacent mucosa," *PLOS ONE*, vol. 13, no. 12, p. e0208584, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0208584.
- [83] J. Wu *et al.*, "Tongue Coating Microbiota Community and Risk Effect on Gastric Cancer," *J. Cancer*, vol. 9, no. 21, pp. 4039–4048, 2018, doi: 10.7150/jca.25280.
- [84] L. V. Mellaert, S. Barbé, and J. Anné, "Clostridium spores as anti-tumour agents," *Trends Microbiol.*, vol. 14, no. 4, pp. 190–196, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.tim.2006.02.002.
- [85] K. Łukasiewicz and M. Fol, "Microorganisms in the Treatment of Cancer: Advantages and Limitations," *Journal of Immunology Research*, Feb. 27, 2018. <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/2397808/> (accessed Sep. 15, 2020).
- [86] Y.-L. Zhang *et al.*, "Clostridium sporogenes delivers interleukin-12 to hypoxic tumours, producing antitumour activity without significant toxicity," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 59, no. 6, pp. 580–586, 2014, doi: 10.1111/lam.12322.
- [87] W. Liang *et al.*, "Gut microbiota shifts in patients with gastric cancer in perioperative period," *Medicine (Baltimore)*, vol. 98, no. 35, p. e16626, Aug. 2019, doi: 10.1097/MD.00000000000016626.
- [88] C. M. Dejea *et al.*, "Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria," *Science*, vol. 359, no. 6375, pp. 592–597, Feb. 2018, doi: 10.1126/science.aah3648.

- [89] C. V. Chagneau *et al.*, “The Polyamine Spermidine Modulates the Production of the Bacterial Genotoxin Colibactin,” *mSphere*, vol. 4, no. 5, Oct. 2019, doi: 10.1128/mSphere.00414-19.
- [90] J. H. Kauppila *et al.*, “Short DNA sequences and bacterial DNA induce esophageal, gastric, and colorectal cancer cell invasion,” *APMIS*, vol. 121, no. 6, pp. 511–522, 2013, doi: 10.1111/apm.12016.
- [91] P. Sittipo, S. Lobionda, K. Choi, I. N. Sari, H. Y. Kwon, and Y. K. Lee, “Toll-Like Receptor 2-Mediated Suppression of Colorectal Cancer Pathogenesis by Polysaccharide A From *Bacteroides fragilis*,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01588.
- [92] A. Mikami, T. Ogita, F. Namai, S. Shigemori, T. Sato, and T. Shimosato, “Oral administration of Flavonifractor plautii attenuates inflammatory responses in obese adipose tissue,” *Mol. Biol. Rep.*, Aug. 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05727-6.
- [93] T. Ogita, Y. Yamamoto, A. Mikami, S. Shigemori, T. Sato, and T. Shimosato, “Oral Administration of Flavonifractor plautii Strongly Suppresses Th2 Immune Responses in Mice,” *Front. Immunol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00379.
- [94] J. Kabeerdoss, V. Sankaran, S. Pugazhendhi, and B. S. Ramakrishna, “Clostridium leptum group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case–control study in India,” *BMC Gastroenterol.*, vol. 13, no. 1, p. 20, Jan. 2013, doi: 10.1186/1471-230X-13-20.
- [95] Y. Yang, K. Takahara, T. Kumrungsee, A. Kimoto, F. Shimamoto, and N. Kato, “Consumption of Low-Dose of Ethanol Suppresses Colon Tumorigenesis in 1,2-Dimethylhydrazine-Treated Rats,” *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 65, no. 5, pp. 443–450, 2019, doi: 10.3177/jnsv.65.443.
- [96] “The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer - Carolina Vieira de Almeida, Antonio Taddei, Amedeo Amedei, 2018.” https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756284818783606?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed& (accessed Sep. 13, 2020).
- [97] S. Verhoog *et al.*, “Dietary Factors and Modulation of Bacteria Strains of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii*: A Systematic Review,” *Nutrients*, vol. 11, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2019, doi: 10.3390/nu11071565.
- [98] C. V. Ferreira-Halder, A. V. de S. Faria, and S. S. Andrade, “Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease,” *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 31, no. 6, pp. 643–648, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.bpg.2017.09.011.