



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σύγχρονες προκλήσεις και βέλτιστες πρακτικές για την ανάλυση του
ανθρώπινου μικροβιώματος

Δρ./ Κύριος Ερευνητής Γεωργιάδης Παναγιώτης

ΑΛΕΞΙΟΥ ΣΩΤΗΡΗΣ
000063
ΑΘΗΝΑ, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

Current challenges and best-practice protocols for Microbiome analysis

PhD /Senior Researcher PANAGIOTIS GEORGIADIS

**SOTIRIS ALEXIOU
000063
ATHENS, 2022**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο
σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος
Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του
Πανεπι-στημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα
Ερευνών.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή
εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Γεωργιάδης Παναγιώτης	Κύριος ερευνητής, Ερευνητής B	
Παπαδόδημα Όλγα	Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας B	
Κατσίλα Θεοδώρα	Ερευνήτρια Γ	

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την καίρια συμβολή και την καθοδήγηση των ερευνητών και των ερευνητριών του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Θέλω να ευχαριστήσω ονομαστικά την τριμελή μου επιτροπή, Παναγιώτη Γεωργιάδη, Όλγα Παπαδόδημα και Θεοδώρα Κατσίλα, καθώς και τον Αριστοτέλη Χατζηγιάννου για την υποστήριξη, ανθρώπινη και επιστημονική, που μου παρείχαν.

Πίνακας Περιεχομένων

Περιεχόμενα

Πίνακας εικόνων.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:.....	2
ΣΚΟΠΟΣ	3
Εισαγωγή	4
Κεφάλαιο 1. Τι είναι το μικροβίωμα και γιατί αποτελεί ερευνητικό πεδίο	6
1.1. Ανθρώπινο Μικροβίωμα.....	6
1.1.1. Εντερικό ίωμα.....	8
1.1.2. Μύκητες στο έντερο.....	9
1.2. Εντερικό μικροβίωμα και ασθένειες.....	10
1.2.1. Εντερική δυσβίωση	10
1.2.1.1. Ιική δυσβίωση	11
1.2.2. Ασθένειες	15
1.2.2.1. Παχυσαρκία.....	15
1.2.2.2. Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	16
1.2.2.3. Καρκίνος της γαστρεντερικής οδού	17
1.2.2.4. Αλλεργίες.....	18
1.3. Θεραπείες και ερευνητικά πεδία.....	18
1.3.1. Βακτηριακές θεραπείες - Προβιοτικά	18
1.3.2. Μεταμόσχευση εντερικού υλικού	19
1.3.3. Πρεβιοτικά.....	20
Κεφάλαιο 2. Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης για τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό των βακτηρίων	22
2.1. Μεταγονιδιωματική	22
2.2. Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων.....	23
2.2.1. Συλλογή δειγμάτων	24
2.2.2. Μεταφορά δειγμάτων.....	24
2.2.3. Προετοιμασία του δείγματος για την ανάλυση και μακροχρόνια αποθήκευση στο εργαστήριο	26
2.2.4. Απομόνωση του DNA των μικροβίων από το δείγμα κοπράνων.....	28
2.2.5. Προκλήσεις και προοπτική.....	29
2.3. Μέθοδοι (16S και Shotgun).....	30
2.3.1. Η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA	30
2.3.1.1. Το γονίδιο 16S rRNA.....	30

2.3.1.3. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου	32
2.3.2. Shotgun ανάλυση	34
2.3.2.1. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου	36
2.4. Αλληλούχιση του DNA των δειγμάτων	36
2.4.1. Ανάλυση του γονιδίου 16S.....	36
2.4.2. Shotgun ανάλυση	37
Κεφάλαιο 3. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	38
3.1. Έλεγχος ποιότητας και φιλτράρισμα των δειγμάτων	39
3.2. Διαδικασία ανάλυσης του γονιδιώματος, ταξινόμηση και εντοπισμός των μικροβίων	40
3.2.1. Ανάλυση του γονιδίου 16S.....	40
3.2.2. Shotgun ανάλυση	41
3.2.2.1. Συναρμολόγηση γονιδιώματος	41
3.2.2.2. Προσδιορισμός γονιδίων και λειτουργιών	42
3.3. Κανονικοποίηση	43
3.3.1. Ποικιλομορφία	44
3.3.1.1. Άλφα ποικιλότητα	45
3.3.1.2. Βήτα ποικιλότητα	45
3.3.2. Τεχνικές κανονικοποίησης	45
3.4. Ανάλυση διαφορικής αφθονίας μικροβίων μεταξύ δειγμάτων	47
3.4.1. Μέθοδοι βασισμένες στην RNA-seq ανάλυση: edgeR και DESeq2	47
3.4.2. MetagenomeSeq	48
3.4.3. ALDEx2	48
3.4.4. ANCOM	49
3.4.4.1. ANCOM-BC	49
3.4.5. Voom	50
3.5. Προκλήσεις και προοπτική.....	50
Βιβλιογραφία.....	52

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1. Τα σημεία του σώματος στα οποία "κατοικούν" οι μικροοργανισμοί, αποτελώντας το συνολικό ανθρώπινο μικροβίωμα.....	6
Εικόνα 2 Τα 4 διαφορετικά μοντέλα ιικής δυσβίωσης.....	14
Εικόνα 3. Διάγραμμα ταξινόμησης του Μπρίστολ.....	27
Εικόνα 4. Οι δυο διαφορετικές μέθοδοι ανάλυσης του μικροβιώματος (βάσει του γονιδίου 16S και Shotgun).....	30
Εικόνα 5. Οι υπερμεταβλητές περιοχές (αμπλικόνια) του γονιδίου 16.....	32
Εικόνα 6. Η διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων με τις βιοπληροφορικές μεθόδους.....	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ανθρώπινος οργανισμός «φιλοξενεί» εκατομμύρια μικροοργανισμούς, με τους οποίους συμβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του, σε μια κατάσταση αρμονικής ισορροπίας. Στο πέρασμα των χρόνων αναπτύχθηκε μια σχέση αλληλεξάρτησης των μικροβίων και του οργανισμού, αφού οι μικροοργανισμοί συμβάλλουν αποφασιστικά και, πολλές φορές, αποκλειστικά σε πολλές σημαντικές λειτουργίες του. Το μεγαλύτερο μέρος του ανθρώπινου μικροβιώματος (95%) βρίσκεται στο έντερο. Μπορεί να λειτουργήσει ως διακριτό μεταβολικό όργανο με μεταβολική ικανότητα που υπερβαίνει το ήπαρ εκατό φορές. Η διαταραχή της μικροβιακής ομοιόστασης που προκαλείται από ανισορροπία στη μικροχλωρίδα και αλλαγές της τοπικής κατανομής τους, ονομάζεται δυσβίωση. Η δυσβίωση σχετίζεται μια σειρά παθολογικών καταστάσεων του οργανισμού, που εκτείνονται σε όλο το σώμα.

Με την ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης και χαρτογράφησης του γενετικού κώδικα (NGS), αναπτύχθηκαν και πολλές βιοπληροφορικές υπολογιστικές μέθοδοι για την ανάλυση της σύστασης και των λειτουργιών του μικροβιώματος, με τη χαρτογράφηση του μεταγονιδιώματος του εντέρου (μεταγονιδιωματική - metagenomics), το οποίο αποτελεί το γενετικό υλικό της μικροβιακής κοινότητας αυτής της περιοχής. Χαρακτηριστικό είναι το Human Microbiome Project που αποτέλεσε τη μεγάλη επανάσταση στην κατανόηση και τη μελέτη του ανθρώπινου μικροβιώματος.

Η διαδικασία και τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται για τη διενέργεια της ανάλυσης, από τη συλλογή του δείγματος εντερικού υλικού μέχρι την αλληλούχιση του μεταγονιδιωματικού DNA και τη βιοπληροφορική συγκριτική ανάλυση διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στα τελικά συμπεράσματα. Πρόκειται για μια περίπλοκη διαδικασία που, συνεχώς, εξελίσσεται, κάνοντας τη μεταγονιδιωματική έναν πολλά υποσχόμενο τομέα στην κατανόηση της λειτουργίας του ανθρώπινου οργανισμού, αλλά και στην ακριβέστερη ανάλυση πολλών ασθενειών, στην πρόληψη και την εξατομικευμένη και αποτελεσματικότερη θεραπεία ή αντιμετώπισή τους.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Ανθρώπινο μικροβίωμα, εντερικό μικροβίωμα, μεταγονιδιωματική, δυσβίωση, αλληλούχιση νέας γενιάς, 16S, shotgun

ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να αναδείξει και να αποτυπώσει την ανάπτυξη των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της σύστασης του οικοσυστήματος του εντερικού μικροβιόκοσμου (EM) και των λειτουργιών του. Αναλύεται, η αρμονική διάδραση των μικροβίων του μικροβιώματος με τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς και η παθογόνα δράση τους στις περιπτώσεις της δυσβίωσης, δηλαδή της διαταραχής της ομαλής αλληλεπίδρασης τους. Αναλύεται επίσης, η διαδικασία από τη συλλογή του δείγματος μέχρι την βιοπληροφορική ανάλυση και την εξαγωγή των συμπερασμάτων για τη σύσταση, την ταξινόμηση και τις λειτουργίες του EM. Έχει αποδειχθεί και ερευνάται εκτεταμένα η συμμετοχή του μικροβιώματος σε μια σειρά σοβαρών ασθενειών και αυτό είναι που κάνει κρίσιμη την ανάλυση και κατανόηση των μεθόδων με τις οποίες επιδρά στη λειτουργία του οργανισμού.

Εισαγωγή

Κάθε κοινωνία σε κάθε χρονική περίοδο, μέσα στον ιστορικό ρου, είχε να αναμετρηθεί με τις ασθένειες και τις πανδημίες της εποχής της. Μέσα από την τεχνολογική και επιστημονική εξέλιξη ο άνθρωπος αντιμετώπιζε τους κινδύνους που εμφανίζονταν, κάθε φορά, όμως, δημιουργούνταν νέοι, οι οποίοι τον απειλούσαν και έπρεπε να περιφρουρηθούν. Η ασθένεια είναι μια κοινωνική κατάσταση αφού επηρεάζεται και από το περιβάλλον μέσα στο οποίο το άτομο γεννιέται, ανατρέφεται, μορφώνεται, εργάζεται και ζει.

Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την υγεία ενός ατόμου είναι γενετικοί, γεωφυσικοί, κλιματολογικές συνθήκες και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η κατοικία, η εργασία, η ρύπανση του περιβάλλοντος, ο τρόπος διαβίωσης, παράγοντες που έχουν άμεση σχέση με τις συνθήκες ζωής μας όπως το κάπνισμα, το αλκοόλ, τη διατροφή, τα ναρκωτικά, η άσκηση, κοινωνικοοικονομικοί, πολιτισμικοί και συμπεριφορικοί παράγοντες, δημογραφικές μεταβολές και μετακινήσεις πληθυσμών, οι κοινωνικές σχέσεις

Η ιστορία της ανθρωπότητας και της προόδου της, φανερώνει πως η υγεία βρίσκεται σε μια συνεχή σχέση αλληλεξάρτησης όχι μόνο με φυσιοπαθολογικούς αλλά και με κοινωνικούς παράγοντες οι οποίοι συνεργατικά συντελούν στην εδραίωση μιας δυναμικής ισορροπίας των εννοιών της υγείας και της κοινωνίας.

Έτσι και το ανθρώπινο σώμα αποτελεί μια μικροκοινωνία, στην οποία συμβιώνουν αρμονικά μαζί με τον άνθρωπο εκατομμύρια μικροοργανισμοί (βακτήρια, ιοί κ.α.) και επικρατούν οι κανόνες που ισχύουν για την ομαλή συμβίωση μέσα σε οποιοδήποτε σύνολο διαφορετικών οργανισμών/ατόμων. Δεν θα μπορούσε, βέβαια, να γίνει αλλιώς, καθώς οι ίδιοι οι κανόνες που περιγράφουν τις κοινωνικές λειτουργίες των ανθρώπων προήλθαν από την παρατήρηση της φύσης και είχαν ως πρότυπο τη συμβίωση και την ανάπτυξη της χλωρίδας και της πανίδας, μέσα από τον πλουραλισμό, τη διαφορετικότητα και τη συνεργασία.

Άρα, όταν διαταράσσεται η λειτουργία και η συμβίωση είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς παράγοντες σε σχέση με το ανθρώπινο σώμα τότε αυτό αποτυπώνεται και στη σύσταση, αλλά και στη λειτουργία και τα παράγωγα των εν λόγω μικροοργανισμών. Κάποια από αυτά τα αποτελέσματα είναι αιτίες για σοβαρές ασθένειες, άλλα είναι αποτελέσματα ασθενειών και δυσλειτουργιών σε άλλα

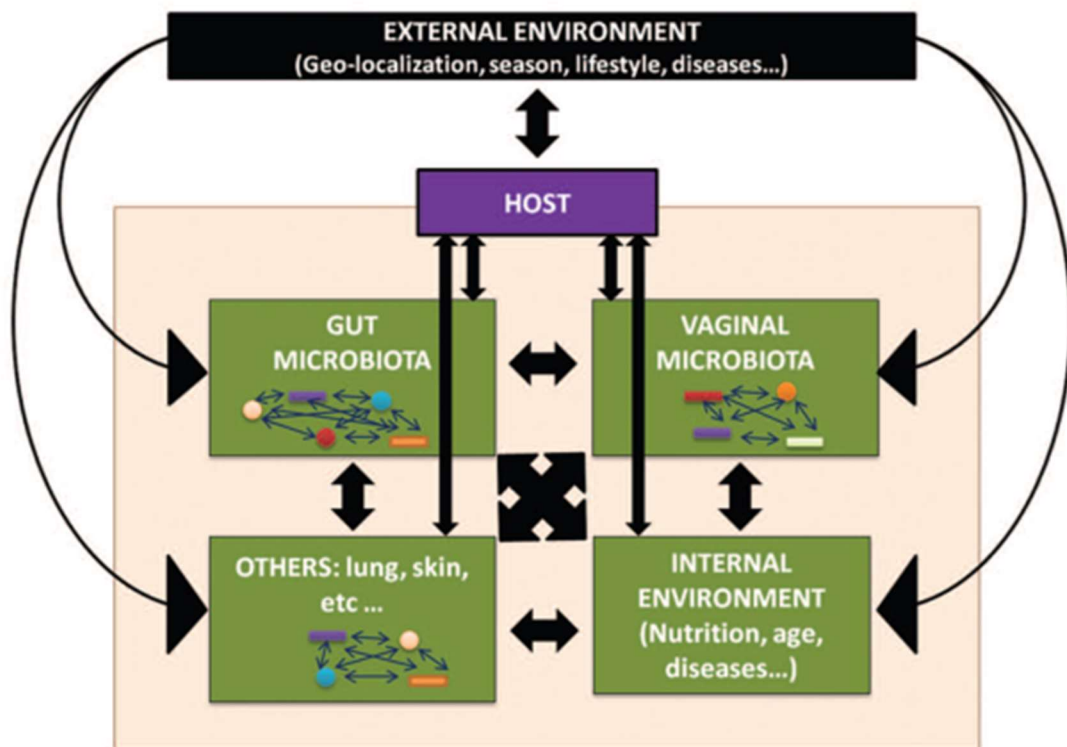
σημεία/όργανα του σώματος. Σε κάθε περίπτωση, όμως, η ανάλυση και γνώση αυτών των συνθηκών εξυπηρετεί την επιστήμη στην ολιστική μελέτη και ανάλυση, με στόχο την κατανόηση και ίαση, πολλών παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών του ανθρώπου.

Επομένως, σε αυτή τη διπλωματική εργασία, θα μελετήσουμε τους λόγους που καθιστούν τόσο σημαντική τη γνώση των κοινοτήτων των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα και κυρίως, το εντερικό μικροβίωμα, τη μελέτη των διακυμάνσεων του αριθμού ή των αλλαγών της αρμονικής τους λειτουργίας, αλλά και τις σύγχρονες μεθόδους, που χρησιμοποιούνται από την επιστημονική και ερευνητική κοινότητα για να εξαχθούν και να αναλυθούν τα δεδομένα που θα μας επιτρέψουν να αποκτήσουμε μια ακόμα πτυχή στην προσπάθεια κατανόησης των λειτουργιών του ανθρώπινου σώματος και των ανωμαλιών και ασθενειών που εμφανίζονται σε αυτό.

Κεφάλαιο 1. Τι είναι το μικροβίωμα και γιατί αποτελεί ερευνητικό πεδίο

1.1. Ανθρώπινο Μικροβίωμα

Ήδη από τη γέννηση του, ο άνθρωπος έρχεται σε επαφή με τον κόσμο των μικροβίων, αφού υπάρχουν παντού στο περιβάλλον. Πολλά από αυτά είναι παθογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό, με κάποια από αυτά, όμως, ο άνθρωπος συμβιώνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Έτσι, σε όλα τα σημεία του σώματος που εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον, σχηματίζονται μικρότερες ή μεγαλύτερες κοινότητες βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Δέρμα, ουρογεννητική οδός, αναπνευστική και γαστρεντερική οδός είναι τα μέρη που «επικοινωνούν» οι μικροοργανισμοί, πολλαπλασιάζονται και, πολλές φορές, λειτουργούν προς όφελος του ανθρώπινου οργανισμού.



Εικόνα 1. Τα σημεία του σώματος στα οποία "κατοικούν" οι μικροοργανισμοί, αποτελώντας το συνολικό ανθρώπινο μικροβίωμα. (Martín R., Miquel S., Langella P., Bermúdez-Humarán L. G., 2014, *The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. Virulence*, pages: 413-423)

Η τεράστια πλειοψηφία των βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών (ιοί, μύκητες, αρχαιοβακτήρια, πρωτόζωα, πολυκύτταρα παράσιτα) που συμβιώνουν με τον άνθρωπο βρίσκονται στο έντερο. Εκεί βρίσκονται περίπου 10^{14} βακτηριακά κύτταρα τα

οποία ανήκουν σε 400 -500 διαφορετικά γένη βακτηρίων.(Fava F., 2019, Wu K., 2018) Γι' αυτό το λόγο, όταν μιλάμε για Ανθρώπινο Μικροβίωμα (AM) αναφερόμαστε στον πληθυσμό των μικροοργανισμών που ζουν μέσα στο ανθρώπινο σώμα και συμβιώνουν αρμονικά ή είναι απαραίτητοι για τον οργανισμό. Το μικροβίωμα διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο και αποτελεί χαρακτηριστικό του κάθε οργανισμού. Η σύσταση, η ποσότητα και η λειτουργία του διαφέρει, όχι μόνο σε σχέση με τον οργανισμό, αλλά και με το φύλο και την ηλικία, ακόμα και όταν μελετάται το ίδιο άτομο. Κάθε οικοσύστημα στο εσωτερικό κάθε ανθρώπου έχει τη δική του δομή, σύνθεση και λειτουργία, η οποία εξαρτάται τόσο από το εσωτερικό όσο και από το εξωτερικό περιβάλλον και από τις συνήθειες της καθημερινότητας του ατόμου. Διαφέρει σε σχέση με τα είδη και τα γένη των μικροοργανισμών που περιέχει, αλλά και την ποσότητα, την αναλογία τους και τα μεταβολικά τους παράγωγα. Οι μικροοργανισμοί που αποτελούν το AM προσαρμόζονται και συμμετέχουν αρμονικά στη λειτουργία του οργανισμού, ενώ είναι απαραίτητοι για μια σειρά σημαντικών διεργασιών, οι οποίες χωρίς τη συμμετοχή των μικροβίων του AM δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν. (Sekiron I.,2010)

Τα βακτήρια του AM εμπλέκονται με την ανθρώπινη φυσιολογία, κυρίως, μέσω των ανοσοποιητικών και μεταβολικών λειτουργιών. Οι πιο χαρακτηριστικές και κυριότερες από αυτές τις διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν ή εκτελούν αποκλειστικά τα βακτήρια του AM είναι:

- **Σύνθεση βιταμινών:** Μια σειρά βιταμινών απαραίτητες για τον οργανισμό παράγονται από τις κοινότητες μικροοργανισμών του AM. Βιταμίνη K, B12, Φυλλικό οξύ κ.α. είναι μερικές μόνο από τις χρήσιμες ουσίες, με τις οποίες το AM τροφοδοτεί τον οργανισμό. Είναι χαρακτηριστικό πως σε πολλά μωρά παρατηρείται έλλειψη βιταμίνης K, στους πρώτους μήνες μετά τη γέννησή τους, καθώς δεν έχουν προλάβει να εγκατασταθούν και να αναπτυχθούν, στο έντερο, τα αντίστοιχα μικρόβια.
- **Μεταβολισμός βασικών μετάλλων, χολικών αλάτων και άλλων θρεπτικών ουσιών:** Με αυτό τον τρόπο, συμβάλλουν στη διαδικασία της πέψης αλλά και της απορρόφησης σημαντικών ουσιών για τη λειτουργία του οργανισμού. Πολλά θρεπτικά συστατικά, βιταμίνες, αλλά και ενέργεια απελευθερώνονται από την τροφή χάρη στο AM. Με τα μεταβολικά ένζυμα που παράγονται από τα μικρόβια του AM ολοκληρώνονται οι διαδικασίες ζύμωσης της τροφής και βιομετατροπής άλλων συστατικών της. Χωρίς αυτά δεν θα γινόταν πλήρης πέψη από τον ανθρώπινο οργανισμό.

- **Καταβολισμός φυτικών ινών και λιπαρών οξέων:** Αυτή η λειτουργία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ενέργειες που επιτελεί το ΑΜ. Τα κύτταρα του εντέρου δεν μπορούν να διασπάσουν, άρα να απορροφήσουν, τους σύνθετους πολυσακχαρίτες των φυτικών ινών και τις πολύπλοκες ενώσεις των λιπαρών οξέων. Τη δουλειά αυτή την επιτελούν τα βακτήρια που «συγκατοικούν» με τα ανθρώπινα κύτταρα στο έντερο. Οι μικροοργανισμοί διασπούν τις σύνθετες ενώσεις, μετατρέποντάς τες σε πολύ απλούστερες ενώσεις (short - chain fatty acids), οι οποίες αποτελούν, από τη μία, θρεπτικό συστατικό για τα εντερικά κύτταρα, από την άλλη υποστηρίζουν και ενεργοποιούν τα κύτταρα της άμυνας του οργανισμού.
- **Ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων και ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος:** Τα μικρόβια του εντέρου λειτουργούν σαν ένα πραγματικό φυσικό εμπόδιο απέναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς που προσπαθούν να εγκατασταθούν και να αναπτυχθούν στο εσωτερικό του ανθρώπινου σώματος. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω του άμεσου ανταγωνισμού για τις θρεπτικές ουσίες του εντερικού υποστρώματος και της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών που εξοντώνουν τα, εχθρικά προς τον οργανισμό, μικρόβια. Συμβάλλουν στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος, στην ανάπτυξη του μηχανισμού ανοσολογικής απόκρισης και στη συντήρηση του επιθηλιακού φραγμού. (Wu K., 2018)

Μάλιστα, το ΑΜ περιέχει περίπου 1,3 φορές περισσότερα κύτταρα, αλλά τουλάχιστον 20 φορές μικρότερα σε μέγεθος σε σχέση με αυτά του ανθρώπινου σώματος και σε έναν ενήλικο άνθρωπο ζυγίζει 1-2,5 κιλά. Το συνολικό γενετικό υλικό των μικροβίων που συνθέτουν το ΑΜ, όμως, περιέχει και 150 φορές περισσότερα γονίδια σε σχέση με το ανθρώπινο γονιδίωμα, αναδεικνύοντας τη σημασία της πληροφορίας, του ρόλου του και των επιπτώσεων στην ορθή – ή μη - λειτουργία του οργανισμού και της φυσιολογίας του.

Για αυτούς τους λόγους το ΑΜ αποκαλείται από τους επιστήμονες και υπερ-οργανισμός ή ξεχασμένο όργανο, ακόμα και εκτεταμένο (δεύτερο) γονιδίωμα του ανθρώπου. (Malard F., 2021)

1.1.1. Εντερικό ίωμα

Το ανθρώπινο μικροβίωμα περιέχει μια πληθώρα μικροβίων και μικροοργανισμών. Από τη σύνθεσή του δεν θα μπορούσαν να λείπουν οι ιοί, η χαρτογράφηση και αλληλούχηση των οποίων βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο. Η γνώση που έχει

αποκτήσει η επιστημονική κοινότητα βασίζεται, κυρίως, σε θραύσματα αλληλουχιών και κατακερματισμένα γονιδιώματα πρώιμων φάγων (προφάγοι), οι οποίοι, πολλές φορές δεν έχουν τη δυνατότητα να παράξουν λειτουργικούς και μολυσματικούς ιούς (φάγους).

Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στα πρώτα δείγματα κοπράνων (μηκώνιο) των νεογνών, παρατηρήθηκε η απουσία μικροσκοπικά ανιχνεύσιμων VLP. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με το συμπέρασμα ότι το εντερικό ίωμα που αποκτάται κυρίως μεταγεννητικά. Το ίωμα του βρέφους αναπτύσσεται παράλληλα με το βακτηριακό μικροβίωμα, με μεγάλες διαφοροποιήσεις στην κοινότητα των φάγων με την ηλικία καθώς οι μικροβιακές κοινότητες επεκτείνονται και διαφοροποιούνται. (Mukhopadhyaya I., 2019)

Σε κάθε γραμμάριο εντερικού περιεχομένου υπάρχουν περίπου 10⁸ τμήματα ιικού γενετικού υλικού. Οι ιοί αλληλεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς, μέσα στο AM, και ανάλογα με τη γενετική πληροφορία του ξενιστή, μπορούν να προκαλέσουν φαινοτυπικές αλλαγές. Οι αλλαγές αυτές άλλοτε είναι προς όφελος του ξενιστή οργανισμού και άλλες φορές εναντίον του.

Ωστόσο, η επίδραση που μπορεί να έχουν αυτοί οι ιοί στο ίωμα του εντέρου και στο ευρύτερο μικροβίωμα του εντέρου είναι ασαφής. Άλλοι παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη δημιουργία του μικροβιώματος του εντέρου του βρέφους περιλαμβάνουν τον τρόπο τοκετού, ο θηλασμός έναντι της σίτισης με μπιμπερό και το κάπνισμα. Αυτοί οι παράγοντες πρέπει ακόμη να διερευνηθούν και να εκτιμηθούν όσον αφορά τη συμβολή τους στη ανάπτυξη και σύσταση του εντερικού ιώματος. (Mukhopadhyaya I., 2019)

1.1.2. Μύκητες στο έντερο

Μεταξύ των πολλών διαφορετικών μικροοργανισμών του AM, βρίσκονται και οι μύκητες. Σε αναλύσεις και μελέτες που έχουν γίνει έχει φανεί ότι το ποσοστό των μυκήτων στο AM είναι πολύ μικρότερο από αυτό των βακτηρίων. Η ανάλυση του πληθυσμού των μυκήτων (μυκοβίωμα) για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρέμενε ιδιαίτερα υποεκπροσωπούμενη στις μελέτες της μικροχλωρίδας. Αυτό είναι λογικό, καθώς οι συχνά χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις για την απογραφή και μελέτη της μικροχλωρίδας, είναι σχεδιασμένες για να στοχεύουν αποκλειστικά το βακτηριακό συστατικό του δείγματος, παραβλέποντας ακούσια τα άλλα συστατικά στοιχεία. Άλλωστε, οι μύκητες περικλείονται από παχύ στρώμα κυττάρων και οι τεχνικές

απομόνωσης και αλληλούχισης του βακτηριακού DNA δεν είναι εφαρμόσιμες σε αυτή την περίπτωση. Ακόμα, όμως, και με τεχνικές ανίχνευσης του DNA των μυκήτων, είναι ακόμα πολύ δύσκολο να μπορέσουμε να αναγνωρίσουμε, να χαρτογραφήσουμε και να κατατάξουμε τους μύκητες, πόσο δε μάλλον, να δημιουργήσουμε δεδομένα αλληλουχιών αναφοράς για κάθε είδος.

Οι μύκητες που ανήκουν στην εντερική μικροχλωρίδα έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή με την απόσβεση ή την προώθηση τοπικών φλεγμονωδών αποκρίσεων, αν και πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν, ακόμα, περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της εντερικής ανοσίας και του των μυκήτων του εντέρου, τουλάχιστον σε σύγκριση με τον μεγαλύτερο όγκο της βιβλιογραφίας. Ένα κρίσιμο εύρημα στο έντερο, ωστόσο, είναι το εξής: Το *C. albicans* είναι ένας κεντρικός διαμορφωτής των αποκρίσεων του ανθρώπινου T helper 17 (Th17) στην υγεία και κατά τη φλεγμονή του εντέρου.

Υπάρχουν τουλάχιστον τρία τεκμήρια που συνδέουν τους μύκητες του εντέρου με φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου (πχ. νόσος του Crohn και ελκώδης κολίτιδα):

- 1) Για μεγάλο χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με νόσο του Crohn φιλοξενούν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων κατά των σακχάρων του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων.
- 2) Οι πολυμορφισμοί απλού νουκλεοτιδίου (SNPs) σε πολλά γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς ή σηματοδότηση έχουν συσχετιστεί με μόρια που μεσολαβούν στην αναγνώριση μυκήτων στον άνθρωπο, οδηγώντας σε φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου.
- 3) Σε μοντέλα ποντικών κολίτιδας που προκαλείται από θειικό νάτριο δεξτράνη (DSS), ο συνεπικισμός των μυκήτων έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τη σοβαρότητα και τον ανοσοφαινότυπο της ανοσολογικής απόκρισης ενώ η χορήγηση του *C. albicans* έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη σοβαρότητα της κολίτιδας.

Προφανώς, δεν έχουν εντοπιστεί επακριβώς ποιοι μύκητες αποτελούν τμήμα του AM, αλλά η μελέτη τους αποτελεί ανοιχτό πεδίο έρευνας και πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα.

1.2. Εντερικό μικροβίωμα και ασθένειες

1.2.1. Εντερική δυσβίωση

Η συμβίωση μεταξύ συμβιωτικών μικροβίων και ζώων είναι το αποτέλεσμα τουλάχιστον 500 εκατομμυρίων ετών συν-εξέλιξης, που οδήγησε σε μια περίπλοκα

ισορροπημένη αλλά συνάμα πολύπλοκη και ποικιλόμορφη μικροβιακή κοινότητα. Η μικροχλωρίδα του εντέρου έχει ποικίλους και ουσιαστικούς ρόλους στον μεταβολισμό του ξενιστή, στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος και ως αντίσταση στον αποικισμό των παθογόνων.

Η δυσβίωση του εντέρου αναφέρεται στις διαταραχές και στην αλλοιωμένη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου που σχετίζεται με λειτουργικές αλλαγές στο μικροβιακό, μεταγραφικό, πρωτεόμικο ή μεταβολικό επίπεδο. Πολλές εντερικές και εξω-εντερικές διαταραχές συνδέονται με τη δυσβίωση του εντέρου, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD), της λοίμωξης, των τροφικών αλλεργιών, του άσθματος, του διαβήτη, της παχυσαρκίας, της σκλήρυνσης κατά πλάκας, του αυτισμού, της περιοδοντίτιδας και του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Δεδομένων των διαφορετικών λειτουργιών της μικροχλωρίδας του εντέρου, η διατήρηση μιας ισορροπημένης μικροχλωρίδας του εντέρου είναι απαραίτητη για την εντερική ομοιόσταση και την ανθρώπινη υγεία. Πριν από περισσότερο από έναν αιώνα, ο νομπελίστας Elie Metchnikoff ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο dysbiosis για να περιγράψει τη διαταραγμένη συμβίωση και θεώρησε ότι η ανθρώπινη υγεία θα μπορούσε να βελτιωθεί με την εισαγωγή ευεργετικών βακτηρίων που βρίσκονται στο γιαούρτι.

Η δυσβίωση του εντέρου πιστεύεται ότι προέρχεται από αλλαγές στον βακτηριακό πληθυσμό, που προκαλείται από διατροφικές αλλαγές, φλεγμονή, ανοσοανεπάρκεια, μόλυνση ή έκθεση σε αντιβιοτικά ή τοξίνες. Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ότι οι διαταραχές της μικροχλωρίδας του εντέρου μπορεί να καλλιεργούν την «άνθιση» άλλων, χαμηλής αφθονίας, επιβλαβών, όμως, βακτηρίων που συμβάλλουν σε ασθένειες. (Sekirov I.,2010, Brüssow H., 2020)

1.2.1.1. Ιική δυσβίωση

Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη δυσβιοτική διαδικασία σε βακτηριακούς πληθυσμούς, όπου υπάρχει μια μετατόπιση από συμβιωτική σε παθογόνο. Τέσσερα διαφορετικά σενάρια μπορούν να συμβούν σε σχέση με τους βακτηριοφάγους και τον βακτηριακό πληθυσμό που μπορεί είτε να υποδηλώνουν εκδηλώσεις ασθένειας είτε σταθερές καταστάσεις ισορροπίας που οδηγούν σε φλεγμονή. Εάν ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνεται με παράλληλη αύξηση των

βακτηριοφάγων, θα σήμαινε ότι οι τελευταίοι πολλαπλασιάζονται, απλώς, ως αποτέλεσμα περισσότερων βακτηρίων ξενιστών. Αντίθετα, μια μείωση και στα δύο συστατικά θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως έλλειψη βακτηριακής λείας που επηρεάζει αρνητικά τους βακτηριοφάγους. Ωστόσο, μια αύξηση στον πλούτο των βακτηριοφάγων με μια ταυτόχρονη μείωση του πλούτου των βακτηρίων έχει μια εντελώς διαφορετική χροιά, καθώς υπονοεί ότι ο πρώτος είναι ο οδηγός και ο ενορχηστρωτής αυτών των αλλαγών. Αυτό το μοτίβο αλλαγών έχει τεκμηριωθεί στο IBD στη θεμελιώδη εργασία από τον Norman και τους συνεργάτες. Τέλος, ο συνδυασμός αυξημένου πλούτου βακτηρίων που συνοδεύεται από μείωση του πλούτου των βακτηριοφάγων υποδηλώνει ότι τα βακτήρια έχουν πλεονέκτημα επιβίωσης και είναι οι εκκινήτες της αλλαγής. Είναι επιτακτική ανάγκη να τηρούνται ισχυροί ορισμοί της νόσου σε συνθήκες ασθένειας για να αποσαφηνιστεί η ακριβής φύση της διαταραχής της περίπλοκης σχέσης βακτηριοφάγων και βακτηρίων στο έντερο.

Πολλά υποθετικά μοντέλα έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την εντερική δυσβίωση που προκαλείται, κατά βάση, από φάγους:

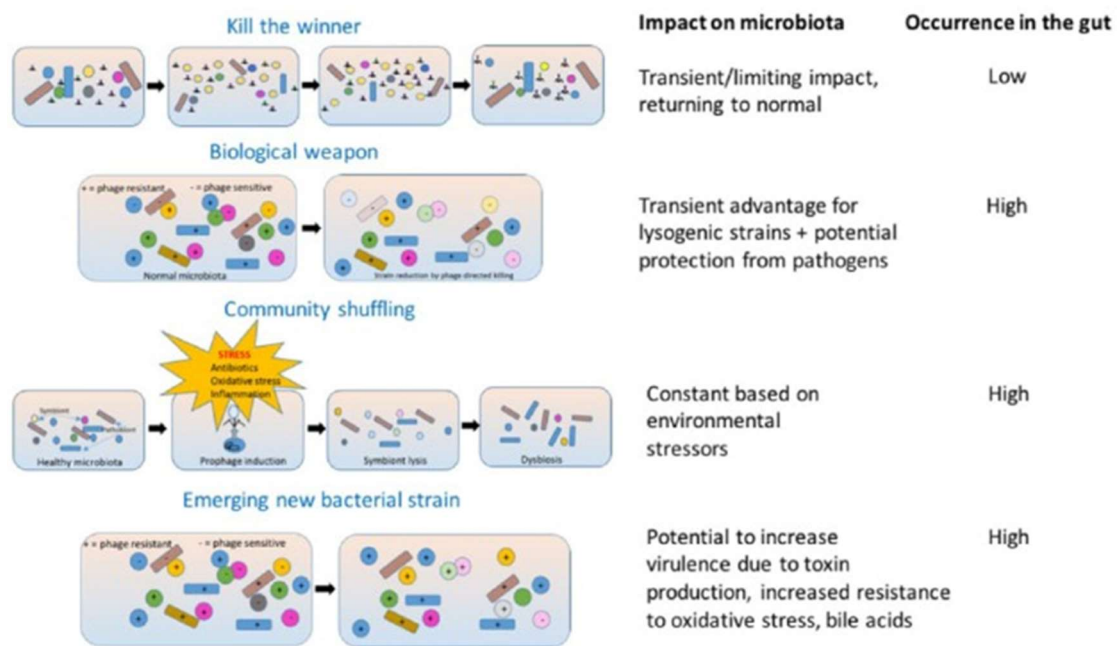
1) Στο μοντέλο «Kill the Winner», οι φάγοι στοχεύουν και σκοτώνουν, κυρίως, συγγενικά βακτήρια που, συνήθως, αναπτύσσονται ταχύτερα, μειώνοντας έτσι τον αριθμό τους κατά την έκταση του εντέρου και τη σύσταση του AM. Το μοντέλο βασίζεται στο ότι ο συγκεκριμένος βακτηριακός πληθυσμός είναι σχετικά υψηλός εντός της κοινότητας και οι φάγοι βασίζονται στην ευκαιριακή επαφή με τον βακτηριακό ξενιστή (ή το θήραμά τους) προκειμένου να μολύνουν και να αναπαραχθούν. Αυτή η προσέγγιση είναι μόνο μια θεώρηση για τη διεργασία που οδηγεί στη δυσβίωση του εντερικού οικοσυστήματος, με περιορισμένες μόνο ενδείξεις ότι αυτό όντως συμβαίνει. Ακόμη και επινοημένα μοντέλα της μικροχλωρίδας του εντέρου, με τη σύνθεση να στηρίζεται σε ένα μόνο βακτηριακό στέλεχος (*E. coli*), παράλληλα με την κολιφάγο λοίμωξη, αποτυγχάνουν να επιδείξουν τα φαινόμενα του παραπάνω ισχυρισμού. Είναι πιθανό, η φυσική δομή και η φυσιολογική κατάσταση του περιβάλλοντος του εντέρου να περιορίζει τέτοιες αλληλεπιδράσεις και να προστατεύει τους βακτηριακούς πληθυσμούς από την επαφή με φάγους.

2) Ένας άλλος μηχανισμός είναι το μοντέλο «Βιολογικό Όπλο», σύμφωνα με το οποίο τα κοινά βακτήρια χρησιμοποιούν τους φάγους, που μεταφέρουν ως όπλα, για να σκοτώσουν ανταγωνιστικά βακτήρια, οδηγώντας σε δυσβίωση. Σκοτώνοντας τα ανταγωνιστικά βακτήρια, οι φάγοι ωφελούν έμμεσα τον ξενιστή τους. Αυτό το μοντέλο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην προστασία από παθογόνα, αν και λείπουν πρόσθετα πειραματικά στοιχεία. Εντός του περιβάλλοντος του εντέρου,

πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ λυσογόνου και ευαίσθητων στελεχών του *E. faecalis* σε μονοαποικισμένα ποντίκια έδειξαν έναν παροδικό εμπλουτισμό του λυσογόνου έναντι των πιο ευαίσθητων στελεχών.

3) Το μοντέλο «Ανακάτεμα κοινότητας» προτείνει ότι οι περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες όπως η αντιβιοτική θεραπεία, το οξειδωτικό στρες ή η φλεγμονή προκαλούν την εισαγωγή του προφάγου στα βακτήρια, με αποτέλεσμα τη λυτική μόλυνση συμβιωτικών βακτηρίων, αλλάζοντας τη σχέση μεταξύ συμβιωτικών και παθογόνων. Υποανασταλτικές συγκεντρώσεις ορισμένων αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένων των κινολονών ή των βήτα-λακταμών, μπορεί να οδηγήσει αυτό το φαινόμενο σε διάφορα βακτήρια του εντέρου. Η φλεγμονή, μέσω της επιδείνωσης του οξειδωτικού στρες, μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη για την επαγωγή του προφήτη.

4) Εκτός από τα τρία μοντέλα που περιγράφονται, τα οποία βασίζονται στην ικανότητα των φάγων να λύουν τους ξενιστές τους, οι φάγοι μπορούν επίσης να μεταφέρουν γονίδια σε βακτήρια για να τροποποιήσουν τον φαινότυπο τους, όπως φαίνεται στο μοντέλο «Emerging New Bacterial Strain» – στην πραγματικότητα εγκαθιστώντας τη λυσογένεση στον οικοδεσπότη τους αντί να προχωρήσουν οι ίδιοι στη διαδικασία αυτή. Μέσα στο πολύπλοκο περιβάλλον του εντέρου, το τι οδηγεί αυτές τις συμπεριφορές είναι άγνωστο, αλλά είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση του οικοσυστήματος. Αρκετές μελέτες μεταγονιδιωμιακής του εντέρου έχουν επισημάνει τη δυνατότητα του ιού να προσδίδει αντίσταση στα αντιβιοτικά και ότι αυτή η συμπεριφορά μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά μεγάλων τμημάτων βακτηριακού DNA μεταξύ στελεχών. Περαιτέρω, υποστηρίζοντας αυτή τη θεωρία, έχει αποδειχθεί ότι οι βακτηριοφάγοι είναι σε θέση να ελέγχουν τις βακτηριακές βιολογικές λειτουργίες μέσω μεταγραφικών παραγόντων των βακτηριοφάγων κατά τη διάρκεια του λυσογονικού κύκλου. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της λυσογένεσης ο μεταγραφικός παράγοντας φάγου *Cro* μπορεί να ενεργοποιήσει το εντεροαιμορραγικό σύστημα έκκρισης τύπου III *E. coli* (T3SS), το οποίο έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη λοιμογόνο δύναμη των βακτηρίων. Η μαθηματική μοντελοποίηση της αλληλεπίδρασης υποδηλώνει ότι τα δίκτυα μόλυνσης που επηρεάζουν τη δυναμική των φάγων και των βακτηρίων μπορεί να περιλαμβάνουν ένα πολύ πιο περίπλοκο πλαίσιο Lotka-Volterra πολλαπλών τύπων. Αυτή η λογιστική εξίσωση σχεδιάζει μαθηματικά την αύξηση του πληθυσμού όταν δύο είδη ανταγωνίζονται για παρόμοιους πόρους στο ίδιο περιβάλλον.



Εικόνα 2 Τα 4 διαφορετικά μοντέλα ιικής δυσβίωσης. (Zeng M. Y., 2017)

Αντίθετα, τα βακτήρια του εντέρου εξελίσσονται ταυτόχρονα και αναπτύσσουν μικροβιακούς αμυντικούς μηχανισμούς έναντι των αρπακτικών βακτηριοφάγων. Το πιο καλά μελετημένο είναι το σύστημα τροποποίησης περιορισμού που περιλαμβάνει βακτηριακές περιοριστικές ενδονουκλεάσες που διασπών το DNA δίκλωνου φάγου. Για να αποφευχθεί η καταστροφή του δικού τους DNA, προστίθενται ομάδες μεθυλίου ή αυξάνουν την παραγωγή ανταγωνιστικών αναστολέων που καθιστούν τους υποδοχείς φάγου μη διαθέσιμους για την πρόσδεση φάγου.

Η πρόσφατη αύξηση στις μεταγονιδιωματικές μελέτες θα επιτρέψει αυτές τις αλληλεπιδράσεις να διερευνηθούν λεπτομερέστερα τα επόμενα χρόνια. Αυτή η προσέγγιση έχει ήδη οδηγήσει στην ανακάλυψη άγνωστων μέχρι τώρα ιών. Μια ιδιαίτερα εντυπωσιακή περίπτωση ιού που ανακαλύφθηκε μέσω της μεταγονιδιωματικής είναι το cAssphage, ο οποίος είναι μακράν ο πιο άφθονος συνδεδεμένος με τον άνθρωπο, γνωστός, ιός, που αποτελεί έως και το 90% των αλληλουχιών του ιώματος του εντέρου. Η σημασία αυτών των ιών για την υγεία ή την ασθένεια εξακολουθεί να μην είναι ξεκάθαρη. (Zeng M. Y., 2017)

1.2.2. Ασθένειες

1.2.2.1. Παχυσαρκία

Τα μικρόβια του εντέρου αποτελούν έναν παράγοντα του περιβάλλοντος που συμμετέχει στον έλεγχο του σωματικού βάρους και την ενεργειακή ομοιόσταση του οργανισμού. Πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιούν διαγονιδιακά ζώα, καθώς και μελέτες σε ανθρώπους, παρέχουν στοιχεία για τον κρίσιμο ρόλο της εντερικής μικροχλωρίδας στην απορρόφηση ενέργειας και κατά συνέπεια στην εμφάνιση της παχυσαρκίας. Πιο συγκεκριμένα, δείχνουν μια πιθανή σχέση μεταξύ της παχυσαρκίας και των αλλαγών στο ΑΜ του εντέρου, με το συγκεκριμένο μικροβίωμα του εντέρου να σχετίζεται με τον παχύσαρκο φαινότυπο. (Kotzampassi K. 2014)

Είναι, πλέον, καλά τεκμηριωμένο εύρημα ότι η μικροχλωρίδα του ανθρώπινου εντέρου (συνολικά έως 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα) αποτελείται, ως επί το πλείστον, από κατά Gram-positive και αναερόβια βακτήρια. Είναι μοναδικά για κάθε άτομο, εξαιρετικά μεταβλητά μεταξύ ατόμων, και αξιοσημείωτα σταθερά μετά το πρώτο έτος ενός ατόμου στη ζωή. Όμως, παρά αυτή την ατομική μοναδικότητα και την υψηλή ποικιλομορφία που επιδεικνύουν στους ανθρώπους, υπάρχει μόνο ένας μικρός αριθμός μικροβιακών φύλων που είναι αριθμητικά κυρίαρχα: Firmicutes και Bacteroidetes αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% του ΑΜ.

Νεότερες έρευνες αποκαλύπτουν ότι τα παχύσαρκα ζώα και άνθρωποι έχουν αλλοιώσεις στη σύσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου, σε σύγκριση με τους πιο αδύνατους ομολόγους τους. Παρατηρήθηκε πως στα παχύσαρκα υποκείμενα μια μεγαλύτερη εκπροσώπηση των Firmicutes και λιγότερα Bacteroidetes στο εντερικό μικροβίωμα τους, καθώς και μειωμένη βακτηριακή ποικιλότητα συνολικά. Πιθανολογείται λοιπόν, πως η αλλοιωμένη σύσταση του μικροβιώματος, αλλά και μεταβολή της έκφρασης βακτηριακών γονιδίων μπορεί να είναι η αιτία που επηρεάζει διάφορες μεταβολικές οδούς.

Η υπόθεση μιας πιο συγκεκριμένης διαμόρφωσης του ΑΜ στην παχυσαρκία, υποστηρίζεται από διάφορες μελέτες. Οι αριθμοί του βακτηρίου *Bifidobacterium* spp. βρέθηκαν υψηλότεροι στα παιδιά που εμφάνισαν φυσιολογικό βάρος από τη γέννηση τους μέχρι την ηλικία των 7 ετών σε σχέση σε παιδιά που έγιναν υπέρβαρα. Είναι, τώρα, γνωστό ότι η παρουσία του *Bifidobacterium* spp. συνδέεται, συχνά, με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία. Παράλληλα, οι ίδιες έρευνες ανέδειξαν ότι τα επίπεδα του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* ήταν χαμηλότερα στα παιδιά που διατήρησαν φυσιολογικά επίπεδα βάρους σε σχέση με τα παιδιά που έγιναν υπέρβαρα

αρκετά χρόνια αργότερα. Έτσι, βγήκε το συμπέρασμα ότι η προστασία από την παχυσαρκία που παρατηρείται με τα βακτήρια *Bifidobacterium* μπορεί, εν μέρει, να οφείλεται στις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του, ενώ το *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή χαμηλού βαθμού, οδηγώντας σε κατάσταση υπέρβαρου ατόμου. Επιπλέον, έχουν βρεθεί συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ της μικροχλωρίδας των κοπράνων παχύσαρκων και αδύνατων διδύμων. Ενώ ο πυρήνας του μικροβιώματος του εντέρου είναι παρόμοιος και στα δύο άτομα, τα παχύσαρκα άτομα παρουσιάζουν μειωμένη ποικιλομορφία και αλλοίωση στα μεταβολικά μονοπάτια της μικροχλωρίδας τους, επιπλέον της χαμηλότερης αναλογίας *Bacteroidetes* και τόσο υψηλότερη ποσοστό των ακτινοβακτηρίων (*Actinobacteria*) που σχετίζονται με την παχυσαρκία. (Fava F., 2019)

1.2.2.2. Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (ΦΝΕ) είναι μια οικογένεια χρόνιων φλεγμονωδών διαταραχών του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι ασθενείς με σοβαρό CD συνήθως παρουσιάζουν συστηματικά συμπτώματα όπως κοιλιακό άλγος, διάρροια, κόπωση, ανορεξία και υποσιτισμός, μερικές φορές με στένωση, συρίγγιο ή διάτρηση επιπλοκές. Στην κλινική, IBD είναι συχνά διαγιγνώσκεται ως νόσος του Crohn (CD), που επηρεάζει οποιαδήποτε μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα ή ελκώδη κολίτιδα, στην οποία βρίσκεται η παθολογία περιορίζεται κυρίως στο κόλον. (Μεντής Α., 2013)

Μέχρι και σήμερα δεν έχει αποδειχτεί ότι συγκεκριμένα βακτήρια προκαλούν τις ΦΝΕ. Σε ασθενείς με ΦΝΕ, το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό το σύστημα είναι υπεραντιδραστικό απέναντι στην εντερική μικροχλωρίδα σε γενετικά ευαίσθητα άτομα και τα είδη της εντερικής χλωρίδας μειώνεται κατά περίπου 30 –50%. Σε πολλές μελέτες έχει φανεί και αποδειχθεί η αλλαγή της σύνθεσης του AM κατά την εμφάνιση αυτών των νόσων. Για παράδειγμα, εντοπίζεται μείωση βακτηρίων του φύλου *Firmicutes*, κρίσιμων για την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου, όπως το βουτυρικό οξύ, με ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες.

Εκτός από τα προστατευτικά τους αποτελέσματα, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, έναντι παθογόνων, τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των μικροοργανισμών του AM βοηθούν στη διατήρηση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Επομένως, μειώνεται η πιθανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού να παράξει μια υπεραντιδραστική απόκριση στα κοινά βακτήρια. Ωστόσο, όταν ο επιθηλιακός φραγμός κινδυνεύει από χημικές, παθογόνες ή φλεγμονώδεις προσβολές, το ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να αντιμετωπίσει την εμφάνιση των υπεράριθμων

ή ευκαιριακά ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Τις περισσότερες φορές, το ανοσοποιητικό σύστημα ανταποκρίνεται κατάλληλα για να προστατεύει τον ξενιστή από την εισβολή των μικροβίων, ενώ διατηρεί μακροχρόνια ανοχή στα αντίστοιχα της μικροχλωρίδας.

Συμπερασματικά, παρατηρείται ότι η παρατεταμένη κατάρρευση του εντερικού φραγμού συνδέεται με πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, αν και οι μηχανισμοί που την προκαλούν και οδηγούν σε αυτές εξακολουθούν να προσδιορίζονται και να αναλύονται βαθύτερα συνεχώς. (Grigg J. B., 2017)

1.2.2.3. Καρκίνος της γαστρεντερικής οδού

Ο καρκίνος είναι η πιο θανατηφόρα πάθηση για τον άνθρωπο. Μάλιστα, ο ορθοκολικός καρκίνος ευθύνεται για περίπου 600.000 θανάτους το χρόνο. Πέρα από τις μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων (APC, TP53, KRAS, CTNNB1), στην εμφάνιση της νόσου συμβάλλουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι διατροφικές συνήθειες και ο τρόπος ζωής, αφού έχει φανεί μέσα από μελέτες πως η εμφάνιση, αλλά και οι επιπτώσεις της νόσου είναι πολύ μικρότερες στις αναπτυσσόμενες απ' ότι στις ανεπτυγμένες χώρες. Σε πιο πρόσφατες μελέτες, φάνηκε πως οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου συμβάλλουν στην ανάπτυξη πολυπόδων και αδενοκαρκινωμάτων στην περιοχή αυτή, όπου στη συνέχεια υπάρχει μεγάλη προδιάθεση στη μετάπτωσή τους σε δυσπλαστικά αδενώματα και την εμφάνιση καρκίνου στο έντερο.

Επομένως, η μικροχλωρίδα του εντέρου μπορεί να επιδρά στο μηχανισμό καρκινογένεσης είτε μέσω της δίαιτας είτε μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης της στο βλεννογόνο του εντέρου, κάτι που έχει φανεί και από έρευνες στις οποίες αποδεικνύεται η συσχέτιση του AM με τον καρκίνο του εντέρου. Συγκεκριμένα, φαίνεται η αλλαγή της σύστασης της μικροχλωρίδας του εντέρου πριν εμφανιστεί μια παθολογία κατάσταση σε αυτό. Για παράδειγμα, η σύσταση του AM των ασθενών με πολυποδίαση είναι επίσης διαφορετική από αυτή των μαρτύρων, προσεγγίζοντας εκείνη που παρατηρήθηκε στο AM των ασθενών με καρκίνο του εντέρου. Ή σε νεότερες μελέτες, με χρήση σύγχρονων μεθόδων, έχει επιχειρηθεί να συνδυαστεί η δυσβίωση των μικροβίων της εντερικής μικροχλωρίδας με τον ορθοκολικό καρκίνο και είναι αξιοσημείωτο ότι όλες οι μελέτες βρίσκουν εμπλουτισμένη τη χλωρίδα σε *Fusobacterium* spp. (Μεντής Α.,2013)

1.2.2.4. Αλλεργίες

Ο αρχικός χρόνος έκθεσης του οργανισμού, μετά τη γέννηση, στην εντερική μικροχλωρίδα είναι σημαντικός όχι μόνο για την ανάπτυξη και την ωρίμανση της ανοσιακής απάντησης αλλά και για την προστασία από μελλοντικές ανοσοαλλεργικές νόσους. Η εντερική χλωρίδα χρειάζεται για την εκπαίδευση τόσο της τοπικής ανοσίας του βλεννογόνου όσο και της συστηματικής. Σύμφωνα με επιδημιολογικές παρατηρήσεις, στις αναπτυσσόμενες χώρες παρατηρείται μικρότερη επίπτωση σε αλλεργικά νοσήματα όπως το άσθμα σε σχέση με τις αναπτυγμένες. Για την ερμηνεία των εν λόγω παρατηρήσεων αναπτύχθηκε η «υπόθεση υγιεινής», σύμφωνα με την οποία η μη έκθεση σε παθογόνα βακτήρια ή προϊόντα μη παθογόνων βακτηρίων κατά την παιδική ηλικία μπορεί να οδηγήσει σε ασθματικό φαινότυπο λόγω επίδρασης στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες υπάρχουν μεγαλύτερες οικογένειες, στο ότι μεγάλο τμήμα του πληθυσμού διαμένει σε αγροτικές περιοχές με λιγότερο καλές συνθήκες υγιεινής και στο ότι παράλληλα παρατηρείται μικρότερη χρήση αντιβιοτικών.

Προοπτικές μελέτες έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι σημαντικές μειώσεις σε ορισμένες κατηγορίες μελών του AM κατά τα πρώτα στάδια της ζωής συσχετίζονται με την εμφάνιση αλλεργικών συμπτωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των *Bifidobacterium* και των εντεροκόκκων φάνηκε ότι έχουν σχέση με αλλεργικά συμπτώματα στους πρώτους μήνες της ζωής. Πρέπει, όμως, να τονιστεί ότι τα επίπεδα των στελεχών των εντεροκόκκων επέστρεψαν σε εκείνα των υγιών παιδιών ύστερα από 6 μήνες. Αυξημένος λόγος *Bacteroidetes/Bifidobacterium* αναφέρθηκε κατά το δεύτερο χρόνο της ζωής σε παιδιά που εμφάνισαν συμπτώματα ατοπίας. Παλαιότερη μελέτη έδειξε αφ' ενός ότι τα παιδιά που ανέπτυξαν εν τέλει αλλεργίες ήταν λιγότερο συχνά αποικισμένα με στελέχη *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Clostridium difficile* κατά το 2ο μήνα της ζωής και αφ' ετέρου ότι τα παιδιά που διέμεναν σε μεγαλύτερα νοικοκυριά είχαν μεγαλύτερη ποικιλομορφία στο προφίλ της μικροχλωρίδας τους.

1.3. Θεραπείες και ερευνητικά πεδία

1.3.1. Βακτηριακές θεραπείες - Προβιοτικά

Πολλά είδη βακτηρίων έχουν πλέον χαρακτηριστεί και χαρτογραφηθεί σε σχέση με την προστατευτική βιοδραστηριότητα τους και πολλά αποτελούν μέρος του μεταγονιδιακού πυρήνα του συνόλου της μικροχλωρίδας του εντέρου. Έτσι, λοιπόν, πολλοί ερευνητές έχουν προχωρήσει τις έρευνες σε κλινικές δοκιμές (φάση 1 και φάση 2) για τη δημιουργία φαρμακευτικής κάψουλας που μεταφέρει βιοενεργά βακτήρια στο

έντερο σε μια προσπάθεια αντιμετώπισης ή μετριασμού των κινδύνων σε συγκεκριμένες ασθένειες.

Έτσι, μια ποικιλία φυσικών και γενετικά τροποποιημένων μη παθογόνων βακτηριακών ειδών διερευνώνται ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, είτε για την παροχή άμεσων ογκοκτόνων αποτελεσμάτων είτε για την παροχή ογκοκτόνων μορίων. Η αντίσταση στις συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες σε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους έχει προκαλέσει την ανάγκη εναλλακτικών θεραπειών για τον καρκίνο. Επιπλέον, η επιτυχία των νέων θεραπειών καρκίνου εξαρτάται από την εκλεκτικότητά τους για καρκινικά κύτταρα με περιορισμένη τοξικότητα στους φυσιολογικούς ιστούς. Ζωντανά, εξασθενημένα ή γενετικά τροποποιημένα μη παθογόνα βακτηριακά είδη έχουν την ικανότητα να είναι επιλεκτικά σε όγκους και να αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Λόγω της εκλεκτικότητάς τους για ιστούς όγκου, αυτά τα βακτήρια και τα σπόρια τους χρησιμεύουν επίσης ως ιδανικοί φορείς για την παροχή θεραπευτικών πρωτεϊνών ενάντια στους όγκους. Οι βακτηριακές τοξίνες έχουν, επίσης, αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενη στρατηγική θεραπείας του καρκίνου. Η πιο πιθανή και πολλά υποσχόμενη στρατηγική είναι η γονιδιακή θεραπεία με ένζυμα προφαρμάκου που βασίζεται σε βακτήρια. Αν και έχει δείξει επιτυχημένα αποτελέσματα *in vivo*, απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με τους μηχανισμούς στόχευσης των βακτηρίων για να γίνει μια πλήρης θεραπευτική προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου. (Patyar S., 2020)

1.3.2. Μεταμόσχευση εντερικού υλικού

Η συμβατική προσέγγιση για τη θεραπεία των ΦΝΕ, όπως η νόσος Crohn, είναι η χορήγηση πολλαπλών κορτικοστεροειδών και ανοσοτροποποιητών πριν από την κλιμάκωση σε μονοκλωνικά αντισώματα, τα μειονεκτήματα, όμως, αυτών των φαρμάκων είναι πολλά. Οι εναλλακτικές προσεγγίσεις θεραπείας με στόχο την τροποποίηση της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας, προκειμένου να υπερνικηθεί η δυσβίωση του εντέρου, έχει γίνει ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο. Η μεταμόσχευση της μικροχλωρίδας των κοπράνων από υγιή δότη είναι μία από τις πιθανές εναλλακτικές επιλογές θεραπείας ΦΝΕ.

Η έννοια της μεταμόσχευσης μικροβίων κοπράνων για τη θεραπεία των ασθενειών του ανθρώπινου εντέρου καταγράφηκε για πρώτη φορά στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική (TCM) τον τέταρτο αιώνα. Στη σύγχρονη ιατρική, η μεταμόσχευση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή θεραπεία χιλιάδων περιπτώσεων με λοίμωξη από

Clostridium difficile και περιορισμένων περιπτώσεων με ΦΝΕ, με μεγάλη επιτυχία (κοντά στο 90%, αλλά σε πολύ μικρό δείγμα μεταμοσχεύσεων).

1.3.3. Πρεβιοτικά

Ως πρεβιοτικά ορίζονται ζωντανοί μικροοργανισμοί που, κατά την κατάποση, δρουν ωφελώντας τον ξενιστή, αλλάζοντας τη μικροβιολογική ισορροπία στο έντερο. Πρόσφατη μελέτη απέδειξε, απροσδόκητα, ότι δεν επιτεύχθηκαν ευεργετικά αποτελέσματα με προβιοτικά μόνο από ζωντανά βακτήρια αλλά και από αδρανοποιημένα, με θερμότητα ή ακτινοβολία γάμμα, βακτήρια και απομονωμένο βακτηριακό DNA.

Τα πρεβιοτικά παρασκευάσματα βασίζονται, κυρίως, σε μια ποικιλία βακτηρίων γαλακτικού οξέος (γαλακτοβάκιλλοι, *bifidobacteria* και στρεπτόκοκκους), που είναι φυσιολογικά, αβλαβή και σημαντικά συστατικά της ανθρώπινης γαστρεντερικής μικροχλωρίδας. Το μείγμα προβιοτικών περιέχει συχνά ορισμένα μη παθογόνα βακτήρια όπως το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) ή εντερόκοκκοι (π.χ. *Enterococcus faecies*) ή ζυμομύκητες *Saccharomyces boulardii*. Τα προβιοτικά στελέχη πρέπει να είναι ανθρώπινης προέλευσης και οι απαιτούμενες ιδιότητές τους περιλαμβάνουν: ανθεκτικότητα σε οξέα, ικανότητα επιβίωσης και να είναι μεταβολικά ενεργά εντός του εντερικού αυλού. Τα προβιοτικά πρέπει, επίσης, να είναι ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων βακτηρίων μέσω πολλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, του ανταγωνιστικού αποκλεισμού παθογόνων ή της επαγωγής της μείωσης του pH του αυλού του παχέος εντέρου. Επιπλέον, πρέπει να ασφαλή και ελεγμένα για ανθρώπινη χρήση.

Διαφορετικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί ότι συμβάλλουν στην προστατευτική λειτουργία της μικροχλωρίδας του εντέρου, όπως στη διατήρηση ενός φυσικού φραγμού κατά του αποικισμού ή της εισβολής από παθογόνα μικρόβια, διευκολύνοντας την πέψη και την αφομοίωση των θρεπτικών ουσιών, παρέχοντας, παράλληλα, σήματα ανοσολογικής επιτήρησης στον αυλό του βλεννογόνου του εντέρου. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι φυσιολογικοί «κάτοικοι» του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα και αποτελούν κύρια συστατικά της χλωρίδας στο λεπτό έντερο. Θεωρούνται ωφέλιμα για τον οργανισμό-ξενιστή και ως τέτοια καλλιεργήθηκαν και αναπτύχθηκαν για πρεβιοτικές εφαρμογές.

Η χρόνια φλεγμονή στο γαστρεντερικό τοίχωμα του ασθενούς με ΦΝΕ φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα μιας μη φυσιολογικής απόκρισης του ξενιστή στην ενδογενή

μικροχλωρίδα. Έτσι, η τροποποίηση των βακτηρίων του ξενιστή με αντιβιοτικά ή προβιοτικά θα μπορούσε να έχει κάποια ευεργετική επίδραση στην πορεία της ΦΝΕ.

Τα πρεβιοτικά μπορούν να επιτύχουν και να διατηρήσουν ύφεση σε ασθενείς με UC, πρόληψη μετεγχειρητικής υποτροπής CD, πρόληψη και διατηρούν την ύφεση στη φλογίτιδα, αλλά τα προβιοτικά έχουν μόνο καθιερώσει τη δική τους ρόλο στο UC και την οσφυαλγία. (Mach T., 2006)

Κεφάλαιο 2. Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης για τον εντοπισμό και το χαρακτηρισμό των βακτηρίων

2.1. Μεταγονιδιωματική

Η κλινική μικροβιολογία και τα ερευνητικά ινστιτούτα βασίζονταν, παραδοσιακά, στη μελέτη του φαινότυπου των βακτηρίων εντός μιας καλλιέργειας. Με αυτό τον τρόπο αναγνωρίζονταν τα παθογόνα βακτήρια, ταξινομούνταν και έτσι γινόταν η μελέτη και η έρευνα πάνω σε αυτά. Όμως, υπάρχουν πολλά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων που βρίσκονται στο AM, τα οποία δεν είναι δυνατό να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν, υπάρχουν άλλα που αναπτύσσονται με πολύ αργούς ρυθμούς και άλλα που έχουν εξαιρετικά σπάνιους και ασυνήθιστους φαινότυπους, πράγμα που δημιουργεί δυσκολίες στην αναγνώριση των μικροοργανισμών.

Γι' αυτούς τους λόγους, με την ανάπτυξη της NGS (Next Generation Sequencing) τεχνολογίας για την αλληλούχιση του γονιδιώματος ταχύτερα και φθηνότερα, αναπτύχθηκαν νέες σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης του βακτηριδιακού γονιδιώματος για τον εντοπισμό κάθε μικροοργανισμού (μη καλλιεργήσιμου και καλλιεργήσιμου, γνωστού και αγνώστου) μέσα σε σύνθετο και πολύπλοκο δείγμα που ερευνάται. Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό, την αναγνώρισή και την ταξινόμησή των μικροοργανισμών, με τελικό στόχο τη γνώση της σύνθεσης του δείγματος και την κατανόηση της λειτουργίας τους στην εκάστοτε περίπτωση που μελετάται. Η μεταγονιδιωματική (Metagenomics) αναφέρεται στην άμεση γενετική ανάλυση των γονιδιωμάτων που λαμβάνονται από διαφορετικά περιβάλλοντα. Σε αντίθεση με την απλή, μονοτροπική φυλογενετική ανάλυση, συστηματοποιείται η μεταγονιδιωματική πολυτροπική γενετική σύνθεση μικροβιακών κοινοτήτων και ως εκ τούτου παρέχει καλύτερη ταξινομική ανάλυση και γενωμικές πληροφορίες.

Διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες βακτηρίων, αρχαίων, ιών και μονοκύτταρων ευκαρυωτών έχουν κρίσιμους ρόλους στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, τα μικρόβια είναι, συχνά, δύσκολο να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σύγχυση στον εντοπισμό και στην χαρτογράφηση τους, αλλά και στην κατανόηση του τρόπου λειτουργίας των κοινοτήτων. Τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης και μια σειρά από εξελιγμένες στατιστικές και υπολογιστικές μεθόδους έχουν συνδυαστεί, έχοντας μεταμορφώσει τη μικροβιολογία. Ακόμη, υπολογιστικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που επηρεάζουν τόσο τη μεταγονιδιωματική που βασίζεται στη συναρμολόγηση όσο και, τη βασισμένη σε χαρτογράφηση, δημιουργία γονιδιωματικού προφίλ, ιδιαίτερα

δειγμάτων υψηλής πολυπλοκότητας ή περιβάλλοντων που περιέχουν οργανισμούς με περιορισμένη ομοιότητα. Η κατανόηση των λειτουργιών και ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένων στελεχών αυτών των κοινοτήτων προσφέρει βιοτεχνολογική υπόσχεση για θεραπευτική ανακάλυψη και καινοτόμους τρόπους σύνθεσης προϊόντων/φαρμάκων/αγωγής χρησιμοποιώντας μικροβιακά εργοστάσια και να εντοπίσει τη συμβολή των μικροοργανισμών στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου. (Lehtinen I., (2018), Comparison of normalization and statistical testing methods of 16S rRNA gene sequencing data. School of Science. Thesis submitted for examination for the degree of Master of Science in Technology)

2.2. Συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά δειγμάτων

Την τελευταία δεκαετία, δημοσιεύονται εκατοντάδες και χιλιάδες μελέτες που διερευνούν το μυστήριο αμφίδρομων σχέσεων μεταξύ της μικροχλωρίδας των κοπράνων και της ανθρώπινης υγείας, με μια εξαιρετικά γρήγορη ανάπτυξη. Αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη της οικονομικά συμφέρουσας, υψηλής απόδοσης τεχνολογίας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Με αυτό τον τρόπο είναι εφικτό η απόκτηση μεγάλων ποσοτήτων δεδομένων DNA για την αποκρυπτογράφηση του πολύπλοκου μικροβίου κοινότητα στο δείγμα κοπράνων. Σημαντική προϋπόθεση για να είναι επιτυχής η διαδικασία αποτελεί η ύπαρξη αξιόπιστου πρωτοκόλλου συλλογής και διατήρησης των δειγμάτων αυτών. Από το kit συλλογής κοπράνων, την κατάσταση μεταφοράς, την κατάσταση αποθήκευσης και τη μέθοδο εξαγωγής DNA, όλα έχουν κάποια επίπτωση στην ποιότητα του δείγματος, άρα και στα αποτελέσματα της μεταγονιδιωμικής μελέτης με τη χρήση NGS και βιοπληροφορικών μεθόδων.

Οι γενικές αρχές για τη συλλογή δειγμάτων φρέσκων κοπράνων είναι οι εξής:

1) Αποφυγή του κύκλου παγώματος-απόψυξης: Η συνεχής ψύξη - απόψυξη του δείγματος είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες αλλοιώσεις και αποικοδόμηση του DNA των μικροβίων, που περιέχεται στο δείγμα και να προκαλέσει προβλήματα και λανθασμένα συμπεράσματα στη μεταγονιδιωμική ανάλυση.

2) Αποφυγή των μεγάλων διακυμάνσεων της θερμοκρασίας: Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας προκαλούν έντονο στρες στα βακτήρια του δείγματος, κάτι που μπορεί να οδηγήσει πολλά από αυτά στον θάνατο και στην αποικοδόμηση του γενετικού τους υλικού.

3) Ελαχιστοποίηση του χρόνου μεταφοράς: Ο χρόνος μεταφοράς για την αποθήκευση του δείγματος στις αναγκαίες περιβαλλοντικές συνθήκες που θα περιγραφούν παρακάτω, είναι εξαιρετικά σημαντικός, για να αποφευχθεί η αύξηση ή η μείωση διαφορετικών βακτηρίων. Γι' αυτό προτείνεται η αποθήκευσή του σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι το δείγμα να φτάσει στο εργαστήριο. (Wu W.-K., Chen C.-C., Panyod S., Chen R.-A., Wu M.-S., Sheen L.-Y., Chang S.-C., (2019), Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. Journal of the Formosan Medical Association, 118, 545-555.)

2.2.1. Συλλογή δειγμάτων

Σε αντίθεση με την εξέταση για την εύρεση «κρυμμένου» αίματος στα κόπρανα (FOBT), η συλλογή κοπράνων για την ανάλυση του μικροβιώματος απαιτεί μεγαλύτερη προσοχή και σχεδιασμό. Εάν καταστεί δυνατή, η συλλογή μεγάλης ποσότητας δείγματος μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη για την κατανάλωσή της σε διαφορετικές βιοπληροφορικές αναλύσεις (metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics, microbial metabolomics, culturomics). Τα δείγματα των κοπράνων πρέπει να συλλέγονται μαζικά και απευθείας (en masse) και να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή να μην έρθουν σε επαφή με τα ούρα ή τα τοιχώματα της τουαλέτας. Βέβαια, αυτό δημιουργεί, πολλές φορές, αισθήματα ντροπής στα υποκείμενα που προσφέρουν το δείγμα, καθώς η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει αρνητικά αισθήματα που οφείλονται στην αισθητική και την υγιεινή. Έτσι, λοιπόν, αναπτύχθηκαν φιλικά προς τον δότη, εμπορικά δοχεία μιας χρήσης, για να συλλέγονται με έξυπνο τρόπο τα περιττώματα, με τη λιγότερη δυνατή επιμόλυνση. (Wu W.-K., Chen C.-C., Panyod S., Chen R.-A., Wu M.-S., Sheen L.-Y., Chang S.-C., (2019), Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. Journal of the Formosan Medical Association, 118, 545-555.)

2.2.2. Μεταφορά δειγμάτων

Ιδανικά, τα συλλεγόμενα δείγματα πρέπει να μεταφερθούν στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατό και να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες από -20 °C έως - 80 °C. Υπάρχουν δυο τρόποι αποθήκευσης και μεταφοράς των δειγμάτων, που αφορούν τη χρήση ή μη σταθεροποιητή του DNA, ώστε να μην κινδυνεύει η ποιότητα και η ακεραιότητα του γενετικού υλικού.

Παρολαυτά, στην πραγματικότητα είναι πολύ δύσκολο να εφαρμοστεί το ιδανικό σενάριο, αφού ο χρόνος μεταφοράς του δοχείου με το δείγμα από το σημείο συλλογής στο εργαστήριο, συνήθως, είναι απροσδιόριστος. Όταν δεν υπάρχει ο σταθεροποιητής

του DNA, το βασικό πρόβλημα σε αυτή την περίπτωση είναι οι μεγάλες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του δείγματος, που μπορεί να οδηγήσουν σε αυξομείωση (συνήθως μείωση) του αριθμού των βακτηρίων που περιέχει και να επηρεαστεί η PCR διαδικασία απομόνωσης και πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού και, συνεπακόλουθα, η NGS και βιοπληροφορική ανάλυση, οδηγώντας σε ψευδή αποτελέσματα και λανθασμένα συμπεράσματα. Είναι, λοιπόν, ενδεδειγμένη η αποθήκευση του δείγματος σε θερμοκρασίες μέχρι 4 °C κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο, καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία δεν εντοπίζεται σοβαρή μεταβολή της σύστασης των μικροοργανισμών του δείγματος για 24-48 ώρες. Εφόσον, η συλλογή των κοπράνων γίνεται σε υγειονομικό χώρο ή μπορεί το υποκείμενο να μεταφέρει το δείγμα κατευθείαν μετά τη συλλογή στο εργαστήριο, τότε μπορεί να διατηρηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 ώρες. Όμως, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τη διάρκεια της επιτρεπόμενης μεταφοράς κάτω από συγκεκριμένες θερμοκρασιακές συνθήκες.

Αν οι άνθρωποι που προσφέρουν δείγμα βρίσκονται σε απομακρυσμένη περιοχή και δεν έχουν τη δυνατότητα να το αποθηκεύσουν προσωρινά σε ψυγείο στο σπίτι τους, τότε ενδείκνυται να χρησιμοποιηθούν συσκευή συλλογής κοπράνων με σταθεροποιητή DNA. Ο σταθεροποιητής DNA είναι ένα εργαλείο διατήρησης δειγμάτων που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην επιτόπια μελέτη. Τα ρυθμιστικά διαλύματα για τη σταθεροποίηση του DNA έχουν σχεδιαστεί για να προστατεύουν τα μόρια DNA και/ή RNA από την αλλοίωση και την αποικοδόμηση μετά τη συλλογή. Επί του παρόντος υπάρχουν πολλά εμπορικά κιτ με σταθεροποιητικούς ρυθμιστές (buffers) DNA διαθέσιμα στην αγορά, αν και δεν έχουν υποβληθεί όλα σε αυστηρές δοκιμές επικύρωσης.

Ορισμένοι ρυθμιστικοί παράγοντες που σταθεροποιούν το DNA είναι:

- **RNA LaterR:** Το αντιδραστήριο αυτό μπορεί να προστατεύσει το RNA από την ταχεία αποικοδόμηση σε επιτόπια μελέτη και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό για τη μελέτη του AM στα κόπρανα. Άλλωστε αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι το RNA LaterR μπορεί, επίσης, να προστατεύσει το DNA των κοπράνων από την αποικοδόμηση σε θερμοκρασία δωματίου για μέρες και εβδομάδες.
- **95% αιθανόλη:** Η ικανότητα προστασίας του DNA από την 95% αιθανόλη προέρχεται από την ισχυρή πρωτεϊνική της μετουσίωση, ιδιότητα που αναστέλλει τη λειτουργία της ιστόνης DNAase, προστατεύοντας το γενετικό υλικό από την αποικοδόμηση. Μετά από συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης, αποδεικνύεται ότι η αιθανόλη 95% μπορεί να προσφέρει εξαιρετική σταθερότητα και ικανότητα








αναπαραγωγής του συνόλου των δεδομένων για τη σύνθεση της μικροχλωρίδας κοπράνων για την ανάλυση. Άλλωστε κάποια στοιχεία έδειξαν ότι η 95% αιθανόλη μπορεί να είναι ένα αξιόπιστο αντιδραστήριο για τη διατήρηση των μεταβολιτών των κοπράνων.

- **Omnigene-GutR:** Το Omnigene-GutR έχει δομή σωλήνα και περιέχει μια χαλύβδινη σφαίρα εντός του για την ομογενοποίηση δείγματος στο ρυθμιστικό διάλυμα. Παράλληλα, διαθέτει και μοναδικό σχέδιο για τη συλλογή των περιπτωμάτων σε σταθερή ποσότητα ανά συλλογή. Το προστατευτικό αποτέλεσμα του Omnigene-GutR για το DNA έχει επικυρωθεί από αρκετές μελέτες. Υπάρχουν, όμως, τεχνικά

2.2.3. Προετοιμασία του δείγματος για την ανάλυση και μακροχρόνια αποθήκευση στο εργαστήριο

Μόλις το δείγμα φτάσει στο εργαστήριο, θα πρέπει να παραμείνει κατεψυγμένο για μακροχρόνια αποθήκευση στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι το δείγμα κοπράνων μπορεί να διατηρήσει ένα σταθερό μικροβιακό κοινότητα έως και 2 χρόνια μετά την κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ενώ στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ το γενετικό υλικό διατηρείται για μερικούς μήνες. Πριν καταψύξουμε το δείγμα, συνιστάται να χωριστούν τα περιπτώματα σε κλάσματα για μελλοντική εφαρμογή. Η κατάτμηση αυτή, επομένως, μπορεί να αποτρέψει και τους περαιτέρω περιπτούς κύκλους παγώματος-απόψυξης. Επίσης, πρέπει τα κόπρανα να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τον πίνακα Bristol Classification, ώστε να γνωρίζουμε τις περιπτώσεις από τη δριμεία δυσκοιλιότητα έως τη δριμεία διάρροια.

Bristol stool chart

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass)
Type 2		Sausage-shaped but lumpy
Type 3		Like a sausage but with cracks on its surface
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges (passed easily)
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool
Type 7		Watery, no solid pieces, Entirely liquid

Εικόνα 3. Διάγραμμα ταξινόμησης του Μπρίστολ.

(Wu W.-K., Chen C.-C., Panyod S., Chen R.-A., Wu M.-S., Sheen L.-Y., Chang S.-C., (2019), Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. Journal of the Formosan Medical Association, 118, 545-555.)

Βάσει εμπειρίας, έχει εντοπιστεί ότι τα κόπρανα με σκληρή και τραχιά επιφάνεια έχουν μεγαλύτερη διακύμανση στη μικροβιακή τους σύσταση μεταξύ διαφορετικών τόπων συλλογής. Θεωρητικά το εξωτερικό μέρος και το εσωτερικό μέρος ενός κόκκου πρέπει να φιλοξενεί διαφορετική αναλογία αερόβιων/αναερόβιων μικροβίων λόγω της διαφοροποίησης στη συγκέντρωση του οξυγόνου. Επιπλέον, η μικροχλωρίδα μπορεί να ποικίλλει μαζί με τον τύπο και την ποσότητα μη χωνεμένων φυτικών ινών που ελήφθησαν δειγματοληπτικά σε διαφορετικά κλάσματα. Αυτά τα γενικά συμπεράσματα έχουν εξαχθεί από μελέτες στις οποίες προηγήθηκε ομογενοποίηση των δειγμάτων, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι διακυμάνσεις, κάτι που δεν συμβαίνει εφόσον δεν ομογενοποιηθεί το δείγμα.

Ωστόσο, οι παραλλαγές και οι διαφοροποιήσεις εντός του δείγματος εξακολουθούν να είναι ένα άλυτο πρόβλημα για την κατανομή και η ομογενοποίηση του δείγματος μπορεί να μην είναι ευχάριστη δουλειά για το προσωπικό του εργαστηρίου. Έτσι, αν και μέχρι στιγμής δεν έχει υπάρξει ομοφωνία για την αντιμετώπιση της αναγκαιότητας ομογενοποίησης του δείγματος των κοπράνων πριν από την κατανομή, οι πιθανές διακυμάνσεις από τις διαφορετικές δειγματοληψίες πρέπει ακόμα να ληφθούν υπόψη, ειδικά για κόπρανα με ακανόνιστη μορφή και υφή.

Αν το δείγμα προορίζεται για μικροβιακή καλλιέργεια, τότε κατά τη μεταφορά του στο εργαστήριο, είναι καλύτερο να μην αποθηκευτεί σε περιβάλλον πάγου, αλλά σε κρύο περιβάλλον. Σε διαφορετική περίπτωση θα πρέπει το δείγμα να υποστεί τη διαδικασία της απόψυξης, κάτι που σε βάθος χρόνου θα αλλοιώσει τα χαρακτηριστικά του αν γίνει πολλές φορές, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω. Βέβαια, πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένα μηχάνημα που ονομάζεται CryoXtractR για την πρόληψη της εμφάνισης των κύκλων παγώματος-απόψυξης κάτω από επαναλαμβανόμενη ζήτηση καταμερισμού του δείγματος. Αυτός ο εξοπλισμός έχει μια μεγάλη δεξαμενή στη βάση που περιέχει υγρό άζωτο για διατήρηση του δείγματος κατεψυγμένου και έναν κύλινδρο μιας χρήσης με ανοξειδωτή χαλύβδινη βελόνα για την κατάτμηση του δείγματος με περιστροφή υψηλής ταχύτητας. Αυτός ο εξοπλισμός έχει επικυρωθεί ώστε να διατηρεί κατεψυγμένα κατά δείγμα τα δείγματα πλάσματος και ούρων και μπορεί να πραγματοποιήσει δειγματοληψία κοπράνων. (Wu W.-K., Chen C.-C., Panyod S., Chen R.-A., Wu M.-S., Sheen L.-Y., Chang S.-C., (2019), Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. Journal of the Formosan Medical Association, 118, 545-555.)

2.2.4. Απομόνωση του DNA των μικροβίων από το δείγμα κοπράνων

Η διαδικασία εξαγωγής του DNA κοπράνων, συνήθως, περιλαμβάνει βήματα ομογενοποίησης δείγματος, κυτταρική λύση, αφαίρεση ουσιών που δεν περιλαμβάνονται στο γενετικό υλικό και καθαρισμό του DNA. Για την αποτελεσματική απελευθέρωση του βακτηριακού DNA από μια σύνθετη βιομάζα κοπράνων, απαιτείται η χημική και μηχανική λύση των κυττάρων για τη διάσπαση του παχέος ή κηρώδους κυτταρικού τοιχώματος, ειδικά για τα πιο ανθεκτικά Gram βακτήρια και μύκητες.

Για τη διαδικασία της μηχανικής διαταραχής, συνήθως χρησιμοποιείται το εμπορικό κιτ εξαγωγής DNA. Το κιτ αυτό αποτελείται από ένα σωλήνα χτυπήματος σφαιριδίων, το οποίο περιέχει πολλές μικρές σκληρές χάντρες κατασκευασμένες σε διάφορα μεγέθη και με διαφορετικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων κεραμικό, γυαλί, ζirkόνιο ή πυρίτιο. Οι χάντρες είναι χρήσιμες για την ομογενοποίηση του δείγματος και τη μηχανική λύση των βακτηριακών κυττάρων, με μια έντονη διαδικασία χτυπήματος για μερικά λεπτά με έναν δονητή. Σε αυτή τη διαδικασία το υλικό και το μέγεθος των σφαιριδίων, καθώς και ο χρόνος δόνησης παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του χτυπήματος σφαιριδίων και του τελικού αποτελέσματος.

Η διαδικασία εξαγωγής DNA κοπράνων μπορεί να αναπτυχθεί από ένα έμπειρο εργαστήριο ή να γίνει με ένα επικυρωμένο εμπορικό kit απομόνωσης DNA. Για παράδειγμα, δύο από τα πιο διάσημα ερευνητικά έργα χαρτογράφησης του Ανθρώπινου Μικροβιώματος, το MetaHIT (με πρωτοβουλία της ΕΕ) και το Human Microbiome Project (που ξεκίνησε από τις Η.Π.Α.), χρησιμοποίησαν διαφορετικά πρωτόκολλα εξαγωγής DNA από τα ανθρώπινα κόπρανα. Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε ένα δημοσιευμένο πρωτόκολλο εξαγωγής DNA κοπράνων που προτάθηκε από τον Godon και τους/τις συνεργάτες/τριες του. Στη δεύτερη περίπτωση επιλέχθηκε ένα εμπορικό kit εξαγωγής που ονομάζεται PowerSoilR, ένα προϊόν της εταιρείας MO BIO, το οποίο, αρχικά, χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή μικροβιακού DNA από εδάφη. Και οι δύο μέθοδοι εξαγωγής DNA περιέχουν τη μηχανική διαδικασία που αναλύθηκε και είναι αξιόπιστα στην απομόνωση υψηλής ποιότητας DNA κοπράνων. Στη σύγκριση των διακυμάνσεων των αποτελεσμάτων των δυο αυτών μεθόδων φάνηκε ότι το πρωτόκολλο HMP (Human Microbiome Project) είναι πιο αποτελεσματικό στην εξαγωγή DNA από βακτήρια της φυλής των Bacteroidetes σε σχέση με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται από το MetaHIT πρόγραμμα.

Υπάρχουν, όμως, και κοινώς χρησιμοποιούμενα εμπορικά kit απομόνωσης DNA κοπράνων που δεν περιλαμβάνουν μηχανική μέθοδο για τη λύση των κυττάρων. Στην περίπτωση της χρήσης αυτής της μεθόδου, πρέπει να το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται να ληφθεί υπόψιν κατά τη σύγκριση διαφορετικών συνόλων δεδομένων της NGS ανάλυσης και χαρτογράφησης του DNA των κοπράνων. Άλλωστε τα εμπορικά kit εξαγωγής DNA, συνήθως, δεν είναι αποστειρωμένα και μπορεί περιέχουν μικροβιακή βιομάζα στα φιαλίδια ή διαλύματα που μπορεί να μολύνουν τα τελικά προϊόντα DNA σε διάφορους βαθμούς. Για αυτό το λόγο, πρέπει να επιλεγεί πολύ προσεκτικά η μέθοδος εξαγωγής του βακτηριακού DNA από τα κόπρανα, έτσι ώστε να έχουμε ένα επιτυχημένο πείραμα. Επίσης, σημαντικός είναι και ο έλεγχος συμβατότητας του ρυθμιστικού παράγοντα που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του DNA με το kit στο οποίο πραγματοποιείται η διαδικασία.

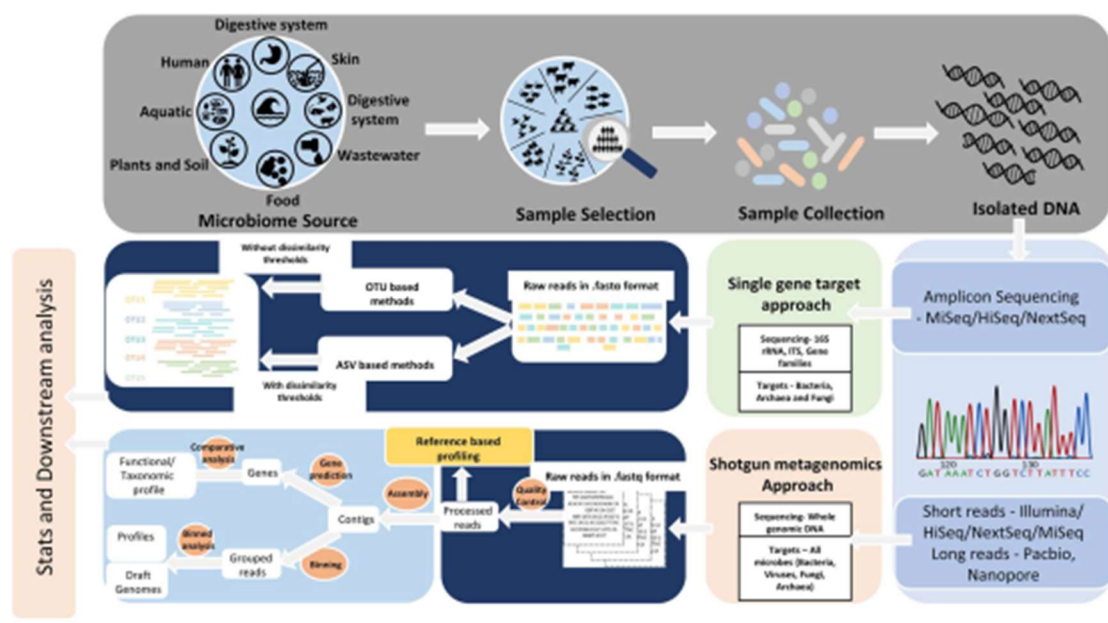
2.2.5. Προκλήσεις και προοπτική

Αν και υπάρχουν συσσωρευμένες γνώσεις και στοιχεία για να συμβάλλουν στον ποιοτικό έλεγχο της δειγματοληψίας για τη μελέτη του μικροβιώματος κοπράνων, παραμένουν ορισμένα κενά και προκλήσεις. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να συζητηθεί εάν η αναερόβια κατάσταση θα πρέπει να διατηρηθεί για συλλογή δειγμάτων από τη στιγμή που υπάρχουν πρωτόκολλα που περιέχουν αναερόβιο σάκο για τα κόπρανα ενώ άλλα όχι.

Μια άλλη διαμάχη είναι εάν θα συμπεριληφθεί ή όχι η διαδικασία ομογενοποίησης πριν από την κατανομή και επιλογή των δειγμάτων για την ανάλυση δεδομένου ότι ο μικροβιακός πληθυσμός από διαφορετικές τοποθεσίες δειγματοληψίας σε ένα ενιαίο κόπρανο μπορεί να είναι αρκετά αποκλίνουσες. Όμως, αν δεν γίνει ομογενοποίηση, υπάρχει πιθανότητα να μην είναι διαθέσιμη αρκετή βιομάζα για να προχωρήσουμε στη μελέτη μας.

Με την ανάπτυξη του τομέα των metagenomics θα μπορέσει να ερευνηθεί σε ακόμα μεγαλύτερο βάθος και να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω η διαδικασία συλλογής, μεταφοράς και προετοιμασίας για την ανάλυση των δειγμάτων.

2.3. Μέθοδοι (16S και Shotgun)



Εικόνα 4. Οι δυο διαφορετικές μέθοδοι ανάλυσης του μικροβιώματος (βάσει του γονιδίου 16S και Shotgun) (Bharti R., Grimm D. G., (2021), Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. Briefings in Bioinformatics, 22(1), pages 178–193.)

2.3.1. Η ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA

2.3.1.1. Το γονίδιο 16S rRNA

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν ριβοσώματα για να μεταφράσουν το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες αναδιπλώνονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες. Επομένως, αυτά τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για το

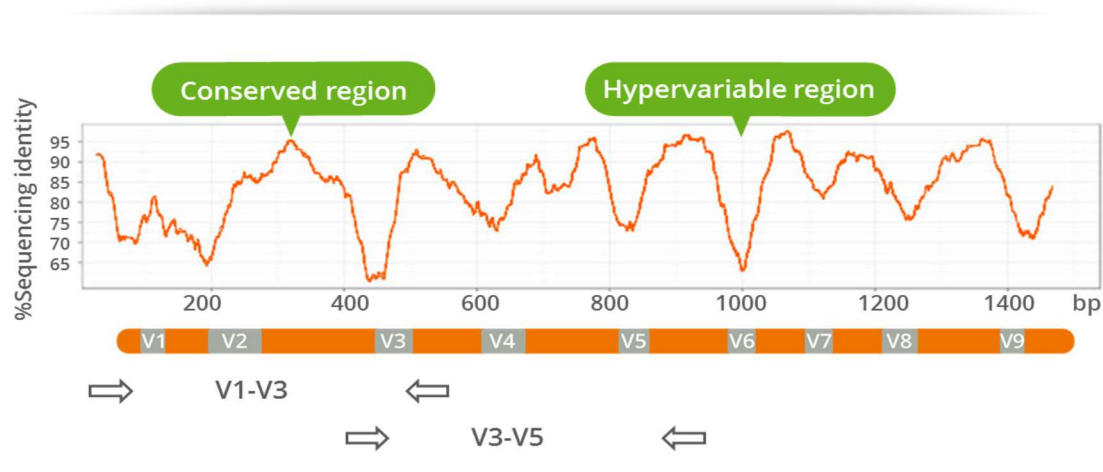
σχηματισμό του ριβοσωμικού RNA μπορούν να αποτελέσουν έναν ασφαλή δείκτη στην έρευνα. Τα γονίδια αυτά είναι πανταχού παρόντα, που σημαίνει ότι μπορούν να βρεθούν στο γονιδίωμα κάθε οργανισμού. Η, σχετικά, απλή λειτουργία του ριβοσώματος παρέμεινε αμετάβλητη χρόνο και μεταξύ των ειδών, και ως εκ τούτου ο ρυθμός εξέλιξης σε αυτήν την περιοχή είναι αργός. Αυτό κάνει τις μεταλλάξεις στο γονίδιο 16S rRNA ένα κάπως ακριβές μέτρο του χρόνου και χρήσιμο στην εκτίμηση της εξελικτικής ιστορίας.

Ορισμένες περιοχές του γονιδίου είναι πιο σημαντικές για τη σωστή λειτουργία του ριβοσώματος από τις υπόλοιπες. Αυτές οι περιοχές παραμένουν αμετάβλητες και έχουν βρεθεί σε υψηλό βαθμό να διατηρούνται σε όλα τα είδη. Οι μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές συχνά οδηγούν σε κακή λειτουργία του ριβοσώματος και, άρα, στον θάνατο του κυττάρου. Αυτές οι περιοχές παραμένουν αμετάβλητες και διαπιστώθηκε ότι διατηρούνται όμοιες σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών. Οι διατηρημένες περιοχές είναι σπουδαίας σημασίας, διότι χρησιμοποιούνται ως γενικοί εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου που μελετάται, αφού είναι περίπου τα ίδια για κάθε μικροοργανισμό και έτσι είναι πιο πιθανό να ταιριάζουν στους περισσότερους από τους οργανισμούς.

Άλλες περιοχές των γονιδίων 16S rRNA είναι λιγότερο σημαντικές για τη λειτουργία του ριβοσώματος και, άρα, πιο ανεκτική σε μεταλλάξεις. Επομένως, αυτές οι περιοχές μεταλλάσσονται πιο γρήγορα και διαθέτουν σημαντική ποικιλομορφία στην αλληλουχία τους μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων. Αυτές οι πολύ μεταβλητές περιοχές, που ονομάζονται υπερμεταβλητές περιοχές, λειτουργούν ως αναγνωριστικά και αποκαλύπτουν πολλές πληροφορίες για την εξελικτική ιστορία των οργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση των εξελικτικών αποστάσεων μεταξύ των ειδών.

Το γονίδιο 16S rRNA υπάρχει, επομένως, σε όλα τα βακτήρια. Το μήκος του είναι, περίπου, 1500 βάσεις και αποτελείται από 9 υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9), ενώ ενδιάμεσα υπάρχουν πιο διατηρημένες, κοινές για όλα τα βακτήρια, περιοχές. Η ευέλικτη δομή του γονιδίου είναι αποτέλεσμα δισεκατομμυρίων χρόνων εξέλιξης και οι υπερμεταβλητές περιοχές του είναι χαρακτηριστικές για κάθε οικογένεια και είδος βακτηρίου. (Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L., Delvoeye M., Van Braekel J., Fu Q., Roosens N. HC., De Keersmaecker S. CJ, Vanneste K., (2019), Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore

Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, Published: 31 December 2019.)



Εικόνα 5. Οι υπερμεταβλητές περιοχές (αμπλικόνια) του γονιδίου 16. (Γεωργιάδης Π., 2021, Εντερικό μικροβίωμα και καρκίνος- μεταταξινομική μελέτη του μικροβιώματος και μεταβολομική μελέτη των προϊόντων ζυμωσης μετα από *in vitro* πέψη του μανιταριού *Pleurotus Eryngii*. Παρουσίαση)

2.3.1.3. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Η ανίχνευση του γονιδίου αυτού μέσα σε ένα σύνθετο δείγμα, συνήθως του ανθρώπινου εντέρου, χύματος ή θαλάσσιου δείγματος χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των βακτηρίων (γνωστών, αλλά και νέων), την εύρεση της ποσότητάς τους στο εξεταζόμενο δείγμα και τον προσδιορισμό της σύστασής του. Εφόσον το γονίδιο υπάρχει σε κάθε βακτήριο και υπόκειται σε διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς και μορφές στις περιοχές V1-V9, ανάλογα με το γένος και τα χαρακτηριστικά του κάθε βακτηρίου, με την ανίχνευσή του μπορεί να γίνει εφικτή η παραπάνω ανάλυση και αναγνώριση.

Η δύναμη της τεχνικής είναι ότι είναι αρκετά ισχυρή ώστε να αναγνωρίζει νέα λειτουργικά γονίδια. Από την άλλη πλευρά, η αδυναμία της τεχνικής είναι ότι δεν μπορεί να παρέχει προφίλ γονιδιακής έκφρασης και να προβλέψει πώς διαφορετικές συνθήκες μπορούν να τη ρυθμίσουν, όπως επίσης, δεν μπορεί να διακρίνει το DNA των ζωντανών κυττάρων από το DNA των νεκρών κυττάρων.

Η εφαρμογή, όμως, της μεθόδου που βασίζεται στην εύρεση, ανάλυση και μέτρηση του γονιδίου 16S rRNA για τον προσδιορισμό του βακτηριακού αριθμού και της

σύνθεσης των δειγμάτων, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Η ορθή λήψη του δείγματος, η διαδικασία απομόνωσης του γονιδίου και ενίσχυσής του, αλλά και η βιοπληροφορική διαδικασία που ακολουθεί είναι μερικοί από τους κρίσιμους παράγοντες που επηρεάζουν καθοριστικά την έκβαση των μελετών αυτού του τύπου. Η PCR διαδικασία που απαιτείται για τη στόχευση και την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί μια πρόσθετη ανησυχία. Αν και οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές είναι, υποτιθέμενα, καθολικοί, στην πράξη, η μεταβλητότητα του γονιδίου 16S rRNA (ακόμη και σε διατηρημένες περιοχές) μπορεί να οδηγήσει σε αναντιστοιχίες που μπορεί να επηρεάσουν την ενίσχυση και ενδεχομένως να επηρεάσουν την αναγνώριση, ειδικά για μικτά, σύνθετα δείγματα που περιέχουν πολλά βακτήρια.

Επιπλέον, όσον αφορά τις εξεταζόμενες περιοχές γονιδίου 16S rRNA, η πιθανότητα σωστής ταυτοποίησης ειδών ποικίλλει ουσιαστικά μεταξύ γενών και ειδών με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας τους, επειδή το γονίδιο 16S έχει χαμηλή διακριτική ικανότητα σε επίπεδο είδους, ακόμη και σε επίπεδο γένους για ορισμένες βακτηριακές ομάδες. Συστηματικές έρευνες έχουν δείξει ότι έως και 90% των βακτηρίων μπορεί να αναγνωρισθεί αξιόπιστα σε επίπεδο γένους και 86% σε επίπεδο είδους, επειδή οι μεταβλητές περιοχές 16S που χρησιμοποιούνται για ταξινόμηση δεν είναι όλες εξίσου διαφοροποιημένες μεταξύ τους και δεν φέρουν ξεκάθαρες πληροφορίες σε διαφορετικά είδη, γένη και οικογένειες.

Τελευταίο μεγάλο πρόβλημα εντοπίζεται στην αναγνώριση αυτής καθαυτής της αλληλουχίας του γονιδίου 16S κάθε βακτηρίου εντός του δείγματος. Ένα σύνθετο δείγμα μπορεί να περιέχει χιλιάδες και εκατομμύρια βακτήρια, άρα, σε αντίστοιχους αριθμούς, και τα τμήματα του γενετικού τους υλικού που μελετάμε. Επομένως, είδη βακτηρίων που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες μπορεί να μην αποκαλυφθούν, ειδικά αν έχουν μικρές διαφοροποιήσεις από αντίστοιχα βακτήρια που βρίσκονται σε πληθώρα στο δείγμα μας. Η συνθήκη αυτή γίνεται ακόμα πιο σύνθετη αν αναλογιστούμε ότι παραλλαγές της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA μπορούν, επίσης, να υπάρχουν στο ίδιο είδος μεταξύ πολλαπλών αντιγράφων του δείγματος. (Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L., Delvoeye M., Van Braekel J., Fu Q., Roosens N. HC., De Keersmaecker S. CJ, Vanneste K., (2019), Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *Published: 31 December 2019.*)

2.3.2. Shotgun ανάλυση

Οι ήδη ανεπτυγμένες αλλά και νέες τεχνολογίες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης νέας γενιάς και μια σειρά από «έξυπνα» υπολογιστικά εργαλεία έχουν συνδυαστεί σε μεθόδους μεταγονιδιωματικής shotgun που έχουν, κυριολεκτικά, μεταμορφώσει τη μικροβιολογία. Ακόμη, τέτοιες υπολογιστικές προσεγγίσεις χρειάζονται για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που επηρεάζουν τόσο τη μεταγονιδιωματική που βασίζεται στη συναρμολόγηση όσο και τη βασισμένη σε χαρτογράφηση και δημιουργία προφίλ, ιδιαίτερα δειγμάτων υψηλής πολυπλοκότητας ή περιβάλλοντων που περιέχουν μικροοργανισμούς με περιορισμένη ομοιότητα με την χαρτογραφημένη αλληλουχία. Η κατανόηση των λειτουργιών και ο χαρακτηρισμός συγκεκριμένων στελεχών αυτών των κοινοτήτων ανοίγει την προοπτική για την ανακάλυψη βιοτεχνολογικών θεραπευτικών μεθόδων και καινοτόμων τρόπων σύνθεσης προϊόντων, χρησιμοποιώντας τα μικρόβια σαν εργοστάσια παραγωγής, αλλά και να εντοπίσει τη συμβολή των μικροοργανισμών στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου.

Οι τεχνικές αλληλούχισης υψηλής απόδοσης επιτρέπουν γονιδιωματικές αναλύσεις ακόμη και όλων των μικροβίων σε ένα δείγμα, όχι μόνο αυτών που είναι επιδεκτικά στην καλλιέργεια. Μια τέτοια μέθοδος, η μεταγονιδιωματική μέθοδος shotgun, είναι η μη στοχευμένη («shotgun») αλληλούχιση όλων των («μετα-») μικροβιακών γονιδιωμάτων που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Η shotgun αλληλούχιση είναι χρήσιμη για την σύνθεση του ταξινομικού προφίλ και τη χαρτογράφηση του λειτουργικού δυναμικού μικροβιακών κοινοτήτων και, προφανώς, για την ανάκτηση ολόκληρων αλληλουχιών του γονιδιώματος.

Πολλές ανακαλύψεις οφείλονται στην τεχνολογία της shotgun αλληλούχισης, τα τελευταία 15 χρόνια που αναπτύσσεται ραγδαία η μεταγονιδιωματική ανάλυση και η εξειδικευμένη, σε επίπεδο DNA, μελέτη των μικροβίων. Κάποιες από αυτές είναι:

- Η αναγνώριση της ενδοσυμβιωτικής συμπεριφορά εντός της κοινότητας βακτηριακών φυλών στο περιβάλλον και ειδών που μπορούν να πραγματοποιήσουν πλήρη νιτροποίηση της αμμωνίας.
- Η ανακάλυψη της ευρείας παρουσίας αντιβιοτικών γονιδίων σε κοινά βακτήρια του εντέρου και η παρακολούθηση ανθρώπινων παθογόνων εστιών.
- Ο εντοπισμός της ισχυρής σύνδεσης των ιών και των βακτηρίων του μικροβιώματος με φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου.
- Η ικανότητα να παρακολουθούνται οι αλλαγές σε επίπεδο στελεχούς στη μικροχλωρίδα του εντέρου μετά από διαταραχές.

Μια τυπική shotgun ανάλυση περιλαμβάνει πέντε βήματα, μετά τον αρχικό σχεδιασμό της μελέτης:

- (i) Η συλλογή, η επεξεργασία και η αλληλούχιση των δειγμάτων
- (ii) Η προεπεξεργασία των αναγνώσεων αλληλουχίας
- (iii) Η ανάλυση της αλληλουχίας για τα ταξινομικά, λειτουργικά και γονιδιωματικά χαρακτηριστικά του προφίλ του μικροβιώματος
- (iv) Η στατιστική και βιολογική ανάλυση των αποτελεσμάτων
- (v) Η επικύρωση και ο έλεγχος του πειράματος και των συμπερασμάτων

Υπάρχουν διαθέσιμες πολυάριθμες πειραματικές και υπολογιστικές προσεγγίσεις για την πραγματοποίηση κάθε βήματος, το οποίο σημαίνει ότι οι ερευνητές έρχονται αντιμέτωποι με πολλαπλές επιλογές. Παρά, όμως τη φαινομενική απλότητά της, η μεταγονιδιωματική shotgun ανάλυση έχει περιορισμούς, λόγω των πειραματικών επιλογών και της πολυπλοκότητας των υπολογιστικών αναλύσεων, αλλά και των ερμηνειών τους.

Το μικροβιακό περιεχόμενο μπορεί να ποικίλλει μεταξύ δειγμάτων από το ίδιο περιβάλλον, γεγονός που περιπλέκει την ανίχνευση σημαντικών στατιστικών και βιολογικών διαφορών μεταξύ μικρών ομάδων δειγμάτων. Είναι, επομένως, σημαντικό να διαπιστωθεί ότι οι μελέτες έχουν επαρκή ισχύ για να ανιχνεύουν διαφορές, ειδικά αν το μέγεθος του αυτής της επίδρασης είναι μικρό. Μια χρήσιμη στρατηγική μπορεί να είναι η υιοθέτηση μιας προσέγγισης δύο επιπέδων, στην οποία η μεταγονιδιωματική shotgun ανάλυση πραγματοποιείται σε ένα υποσύνολο δειγμάτων που έχουν προηγουμένως ελεγχθεί με λιγότερο δαπανηρές μικροβιακές έρευνες, όπως η αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA.

Επίσης, υπάρχει μεγάλη δυσκολία στον έλεγχο των δειγμάτων, ειδικά για αυτά που προέρχονται από πολύπλοκα περιβάλλοντα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη μελέτη της ανθρώπινης μικροχλωρίδα, στην οποία οι μικροβιακές κοινότητες επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως ο γονότυπος του ξενιστή, η ηλικία, η διατροφή, οι συνήθειες της καθημερινότητας και το εξωτερικό περιβάλλον. Όπου είναι εφικτό, προτείνεται να πραγματοποιούνται διαχρονικές μελέτες που ενσωματώνουν δείγματα από τον ίδιο βιότοπο με την πάροδο του χρόνου και όχι μελέτες που συγκρίνουν «στιγμιότυπα» δύο δειγματοληπτικών συνόλων. Οι διαχρονικές μελέτες δεν πρέπει να βασίζονται σε αποτελέσματα από ένα μόνο δείγμα που μπορεί να μην είναι και ακραία αντιπροσωπευτικό. Τέλος, σημαντική είναι η εξαίρεση δειγμάτων που μπορεί να επηρεάζονται από μια ανεπιθύμητη μεταβλητή. Για παράδειγμα, σε μελέτες πάνω στον άνθρωπο, τα κριτήρια αποκλεισμού μπορεί να περιλαμβάνουν την έκθεση

σε φάρμακα που είναι γνωστό ότι επηρεάζει το μικροβίωμα, όπως τα αντιβιοτικά. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, τότε οι πιθανοί παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το AM θα πρέπει να συνυπολογιστούν στις συγκριτικές αναλύσεις. (Bharti R., Grimm D. G., (2021), Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. Briefings in Bioinformatics, 22(1), pages 178–193.)

2.3.2.1. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Το πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι συγκεντρώνονται πληροφορίες σχετικά με τη γενετική ποικιλότητα της μικροχλωρίδας του εντέρου. Οι πληροφορίες σχετικά με τη γενετική ποικιλομορφία και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου επιτρέπουν να γίνουν συσχετισμοί μεταξύ της μικροχλωρίδας του εντέρου και της θέσης της νόσου. Τα μειονεκτήματα της αλληλουχίας μεταγονιδιωματικών κυνηγετικών όπλων είναι ότι είναι δαπανηρή και επίσης η ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων είναι υπολογιστικά έντονη και δεν εκτελείται εύκολα σε γενικά εργαστήρια.

2.4. Αλληλούχιση του DNA των δειγμάτων

Οι shotgun αναλύσεις, ολόκληρου του μεταγονιδιώματος (metagenome) επιτυγχάνονται με την αλληλούχιση του γονιδιώματος όλων των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Εναλλακτικά, μπορούν να βγουν συμπεράσματα με τον προσδιορισμό αλληλουχίας θραυσμάτων PCR από το ριβοσωμικό γονίδιο 16S RNA, του οποίου ο τομέας περιορίζεται στα βακτήρια και τα αρχαία.

Τα δημιουργούμενα σύνολα δεδομένων αποτελούνται από αρχεία κειμένου σε μορφή FASTA ή FASTQ που περιέχουν, στην περίπτωση ενός τυπικού πειράματος, εκατομμύρια τέτοιες αναγνώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη συναρμολόγηση (μερική ή πλήρη) του κλώνου DNA από την οποία προήλθαν. Αυτά τα σύνολα δεδομένων αντιστοιχούν σε αρχεία δεδομένων, το μέγεθος του οποίου μπορεί να ισοπεδώσει, ανάλογα με το βάθος της ανάλυσης αλληλουχίας και την ποιότητα των οργάνων, έως και αρκετά GB, καθιστώντας έτσι τη σωστή επεξεργασία τους, μια περίπλοκη και εντατική εργασία.

2.4.1. Ανάλυση του γονιδίου 16S

Η αλληλούχιση των τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA είναι μια δημοφιλής μέθοδος για τον προσδιορισμό του προφίλ και της σύστασης και τη σύγκριση μικροβιακών κοινοτήτων. Τα πρωτόκολλα και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, ωστόσο, ποικίλλουν σημαντικά όσον αφορά τους εκκινητές ενίσχυσης (primers), τους εκκινητές προσδιορισμού αλληλουχίας (sequencing primers), τις τεχνολογίες του

προσδιορισμού της αλληλουχίας. Ο τρόπος με τον οποίο τα αποτελέσματα επηρεάζονται από αυτές τις επιλογές και εάν τα δεδομένα που παράγονται με διαφορετικά πρωτόκολλα μπορούν να συγκριθούν ουσιαστικά, είναι αβέβαιο.

Σε αυτή τη μέθοδο, το DNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο για PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του συντηρημένης αλληλουχίας του γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA). Εκκινητές (primers), συμπληρωματικοί προς τις διατηρημένες περιοχές, χρησιμοποιούνται έτσι ώστε η περιοχή να μπορεί να ενισχυθεί για οποιοδήποτε βακτήριο, καθώς περιέχεται σε όλα τα βακτήρια, όπως έχει αναλυθεί. Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR, παραμένουν μόνο οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S και πραγματοποιείται προσδιορισμός της αλληλουχίας του. (Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L., Delvoe M., Van Braekel J., Fu Q., Roosens N. HC., De Keersmaecker S. CJ, Vanneste K., (2019), Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, Published: 31 December 2019.)

2.4.2. Shotgun ανάλυση

Το DNA διαλύεται τυχαία σε πολλαπλά μικρά τμήματα, τα οποία αλληλουχούνται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας (chain termination method) για τη λήψη των αναγνώσεων. Πολλαπλές επικαλύψεις αναγνώσεων, για το DNA στόχο, λαμβάνονται, πραγματοποιώντας αρκετούς γύρους αυτού του κατακερματισμού και της αλληλούχισης. Στη συνέχεια, υπολογιστικά προγράμματα χρησιμοποιούν τα επικαλυπτόμενα άκρα των διαφορετικών αναγνώσεων για τη συναρμολόγηση τους σε συνεχή σειρά. (Bharti R., Grimm D. G., (2021), Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 22(1), pages 178–193.)

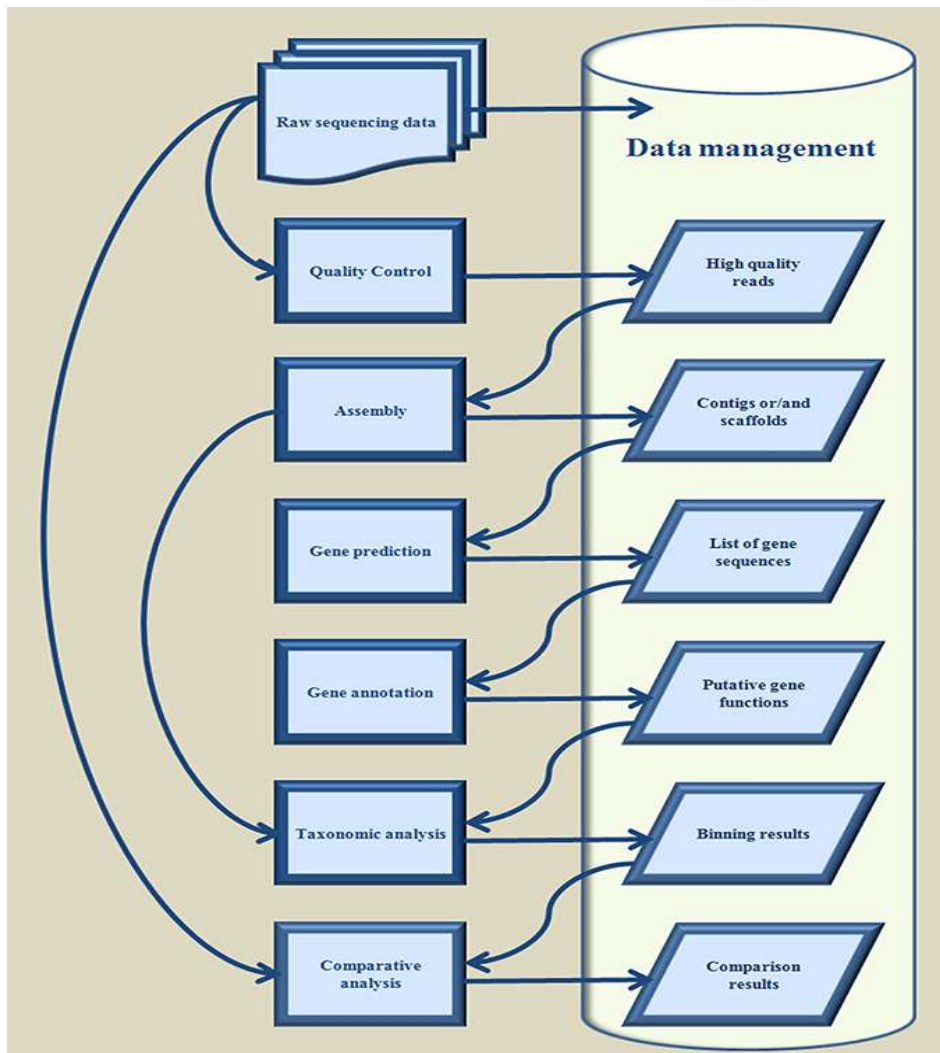
Κεφάλαιο 3. Βιοπληροφορική ανάλυση

Οι τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας DNA υψηλής απόδοσης (high throughput DNA sequencing technologies) έχουν βοηθήσει στην ανάπτυξη της έρευνας του μικροβιώματος, επιτρέποντας τη μελέτη είτε συγκεκριμένων γονιδίων είτε των γονιδιωμάτων όλων των μικροοργανισμών ενός δεδομένου περιβάλλοντος και έναν πιο ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό της αφθονίας και της λειτουργίας του μικροβιώματος.

Ο ταξινομικός σχολιασμός προσπαθεί να λάβει πληροφορίες σχετικά με το είδος της σύνθεσης ενός δεδομένου μεταγονιδιώματος. Από την άλλη, λειτουργικό Ο σχολιασμός επιχειρεί να εντοπίσει τον τρόπο, με τον οποίο οι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν επηρεάζουν την παθολογική κατάσταση του οργανισμού ξενιστή.

Τα κύρια βήματα μιας βιοπληροφορικής μελέτης του μικροβιώματος:

- (1) Έλεγχος ποιότητας και φιλτράρισμα των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης
- (2) Συναρμολόγηση του γονιδιώματος που βρίσκεται στα FASTA ή FASTQ αρχεία
- (3) Ταξινομική ανάλυση των δειγμάτων και εντοπισμός των μικροβίων που περιέχουν
- (4) Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων
- (5) Στατιστική συγκριτική ανάλυση
- (6) Συμπεράσματα



Εικόνα 6. Η διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων με τις βιοπληροφορικές μεθόδους

3.1. Έλεγχος ποιότητας και φιλτράρισμα των δειγμάτων

Το γονιδιωματικό υλικό (DNA), που απομονώνεται από ένα μεταγονιδιωματικό δείγμα, μετασχηματίζεται μέσω των πολύπλοκων πειραματικών πρωτοκόλλων αλληλουχίας DNA σε αναγνώσεις σύντομης αλληλουχίας μεταβλητού μήκους, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα και τα εργαλεία που εφαρμόζονται. Αυτή η διαδικασία, κλήσης βάσης, είναι επιρρεπής σε μεροληψία ανάλογα με έναν αριθμό παραγόντων όπως το περιεχόμενο GC και η πραγματική θέση της βάσης στην ακολουθία. Αυτή η μεροληψία ποσοτικοποιείται με τη μέτρηση της πιθανότητας μιας κλήσης βάσης να είναι ψευδής, παρέχοντας έναν δείκτη της συνολικής ποιότητας της εργασίας της αλληλούχισης. Ο υπολογισμός μιας βαθμολογίας ποιότητας (Phred) για κάθε βάση είναι πλέον δυνατός με αυτόν τον τύπο πληροφοριών να ενσωματώνεται εύκολα στη μορφή αρχείου FASTQ. Πολλά εργαλεία έχουν αναπτυχθεί που μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτές

τις βαθμολογίες και να παρέχουν κατανομές πιθανότητας σφάλματος καθώς και να χρησιμοποιούν κατάλληλους αλγόριθμους φιλτραρίσματος για την περικοπή ακολουθιών με τρόπο που διατηρεί μόνο υψηλής ποιότητας γονιδιωματικές αλληλουχίες.

3.2. Διαδικασία ανάλυσης του γονιδιώματος, ταξινόμηση και εντοπισμός των μικροβίων

Γενικά, για τον σχολιασμό ακολουθιών 16S rRNA χρησιμοποιείται το πρόγραμμα QIIME και για την shotgun ανάλυση το πρόγραμμα MEGAN που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για 16S. Το MEGAN είναι ένα εξαιρετικά αποδοτικό πρόγραμμα για διαδραστική ανάλυση και σύγκριση δεδομένων μικροβιώματος, επιτρέποντας την εξερεύνηση εκατοντάδων δειγμάτων και δισεκατομμυρίων αναγνώσεων. Ενώ το ταξινομικό προφίλ εκτελείται με βάση την ταξινόμηση του NCBI, το MEGAN παρέχει και μια σειρά από διαφορετικές προσεγγίσεις λειτουργικών προφίλ. Το MEGAN Community Edition υποστηρίζει, επίσης, τη χρήση του μεταδεδομένων στο πλαίσιο της ανάλυσης και της ομαδοποίησης των κύριων συντεταγμένων.

Οι ακριβείς διαδικασίες ταξινόμησης που βασίζονται στις ευθυγραμμίσεις ακολουθιών παραμένουν μια υπολογιστική πρόκληση τόσο για τις βιβλιοθήκες 16S όσο και για τις shotgun βιβλιοθήκες, κυρίως, λόγω των μικρών μηκών ανάγνωσης NGS.

Οι shotgun αναγνώσεις μπορούν να αναλυθούν εφαρμόζοντας όλες τις προσεγγίσεις βιοπληροφορικής (συναρμολόγηση, χαρτογράφηση και ανάλυση k-mer, εξαρτώμενη από την ευθυγράμμιση και χωρίς ευθυγράμμιση). Οι αναγνώσεις των αμπλικονίων του 16S αναλύονται, συνήθως, με προσεγγίσεις χαρτογράφησης, ομαδοποίησης και φυλογενετικών προσεγγίσεων, ενώ η συναρμολόγηση εφαρμόζεται μόνο κατ' εξαίρεση.

3.2.1. Ανάλυση του γονιδίου 16S.

Αρχικά, προσδιορίζουμε τις αναγνώσεις 16S rRNA από το αρχικό σύνολο δεδομένων μεταγονιδιώματος χρησιμοποιώντας την αναζήτηση ομολογίας με γνώση δευτερογενούς δομής. Η πλειοψηφία των αναγνώσεων που δεν είναι 16S απορρίπτονται σε αυτή τη διαδικασία, μειώνοντας σημαντικά το μέγεθος του προβλήματος. Έπειτα, κατασκευάζονται τα γραφήματα επικάλυψης. Εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές μείωσης του γραφήματος για την αφαίρεση πιθανών σφαλμάτων

αλληλούχισης και την προετοιμασία του γραφήματος για αποτελεσματική συναρμολόγηση. Το τρίτο στάδιο συναρμολογεί τις αναγνώσεις σε contigs από τους αλγόριθμους εύρεσης διαδρομής. Η διαδικασία εύρεσης διαδρομής στοχεύει στην αποφυγή δημιουργίας χιμαιρικών γονιδίων 16S rRNA. (Yuan C., 2015)

Πριν από την ταξινομική ανάλυση, οι αλληλουχίες των αμπλικονίων, όπως οι περιοχές του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA, συγκεντρώνονται με δύο κύριες προσεγγίσεις. Πρώτον, οι αλληλουχίες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε φυλλότυπους σύμφωνα με την ομοιότητά τους με προηγούμενες χαρακτηρισμένες αλληλουχίες σε μια βάση δεδομένων αναφοράς. Δεύτερον, οι λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) μπορούν να κατασκευαστούν με ομαδοποίηση νέων ακολουθιών, καθαρά με βάση την ομοιότητά τους, η οποία είναι υπολογιστικά πολύ πιο έντονη. Επομένως, συνιστάται μια υβριδική μέθοδος που συνδυάζει και τις δύο προσεγγίσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις, χρησιμοποιείται ένα αυθαίρετο όριο ομοιότητας για τη διαφοροποίηση των συστάδων. Το όριο ομοιότητας 99% είναι γενικά αποδεκτό ως αντιπροσωπευτικό για τα είδη. Ωστόσο, αυτό το όριο είναι συχνά ανεπαρκές για τη διάκριση μεταξύ στενά συγγενικών ειδών, όπως τα διαφορετικά μέλη των οικογενειών *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* και *Peptostreptococcaceae*. (Yuan C., 2015)

3.2.2. Shotgun ανάλυση

3.2.2.1. Συναρμολόγηση γονιδιώματος

Το επόμενο βήμα επεξεργασίας δεδομένων είναι η χρήση αναγνώσεων για τη συναρμολόγηση μεγαλύτερων συνεκτικών δομών ακολουθίας (contigs) και, εάν είναι δυνατόν, κατασκευών που περιέχουν πολλαπλά contigs (scaffolds) με αξιόπιστες συνδέσεις μεταξύ τους. Κάθε ένα από αυτά τα κατασκευάσματα προέρχεται από μια διαφορετική αλληλουχία DNA, η οποία μπορεί να είναι μέρος ενός ή ένα ολόκληρο γονιδίωμα από μόνη της και μπορεί αργότερα να διερευνηθεί για την ανίχνευση ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs), δηλαδή γονιδιωματικές περιοχές, που περιέχουν αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια. Το έργο συναρμολόγησης είναι μέχρι τώρα, από την άποψη του υπολογιστικού φορτίου, το σημείο συμφόρησης για οποιοδήποτε έργο αλληλούχισης είτε τα δεδομένα αντιστοιχούν σε γονιδιώματα μεμονωμένων κυττάρων είτε σε μεταγονιδιωματικά δείγματα. Η συναρμολόγηση αναγνώσεων σε contigs (και scaffolds) είναι μια πολύ επίπονη εργασία, ζητώντας πολύ υψηλούς πόρους ισχύος επεξεργασίας μνήμης, θέτοντας μια σημαντική πρόκληση, για την οποία έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμοι αλγόριθμοι για την αντιμετώπιση διαφόρων ζητημάτων απόδοσης. Ενώ υπάρχουν πολυάριθμοι αλγόριθμοι αφιερωμένοι στη συναρμολόγηση ακατέργαστων δεδομένων NGS, μπορούμε να διακρίνουμε δύο

διακριτικές υπολογιστικές προσεγγίσεις: Η αντιστοίχιση (mapping), που διαβάζει ένα πρότυπο γονιδίωμα ή γονίδιο (16S) και η de novo, δηλαδή χωρίς τη χρήση DNA αναφοράς, διαδικασία.

Η συναρμολόγηση μέσω χαρτογράφησης σε γνωστό γονιδίωμα ως αναφορά μπορεί να παρέχει πολύ αξιόπιστα αποτελέσματα για έργα αλληλούχισης που αφορούν δείγματα μονοκύτταρων οργανισμών, καθώς μπορεί να παρακάμψει προβλήματα απόδοσης που προέρχονται από επαναλήψεις αλληλουχίας, μικρού μήκους αναγνώσεων, χαμηλής κάλυψης αλληλουχίας κ.λπ. (Scheibye-Alsing et al., 2009). Καθοδηγείται κυρίως από την επιλογή του γονιδιώματος αναφοράς που πρέπει να σχετίζεται όσο το δυνατόν περισσότερο φυλογενετικά με το δείγμα αλληλουχίας.

Η συναρμολόγηση de novo είναι μακράν η πιο εντατική υπολογιστική εργασία (Scheibye-Alsing et al., 2009) καθώς απαιτεί αλγόριθμους που εκτελούν όλες τις πιθανές συγκρίσεις μεταξύ των εκατομμυρίων αναγνώσεων προκειμένου να ανιχνευθούν τυχόν επικαλύψεις μεταξύ τους. Αν και η προσπάθεια συναρμολόγησης de novo έχει απλοποιηθεί με νέους αλγόριθμους που εγκαταλείπουν τη μέθοδο OLC και εκμεταλλεύονται μαθηματικές έννοιες όπως γραφήματα de Bruijn, εξακολουθεί να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του πρωτοκόλλου αλληλούχισης (μήκος ανάγνωσης, βάθος αλληλουχίας, κ.λπ.). Ωστόσο, λόγω της τεράστιας ποικιλομορφίας του γονιδιωματικού περιεχομένου σε ένα μεταγονιδιωτικό δείγμα, η χρήση ενός γονιδιώματος αναφοράς αποκλείεται, καθιστώντας έτσι την εντατική υπολογιστική εργασία της de novo συναρμολόγησης τη μοναδική πρακτική εναλλακτική λύση, τουλάχιστον στα πρώτα βήματα μιας αναλυτικής προσπάθειας, όταν δεν υπάρχει προηγούμενη γνώση για τις αλληλουχίες που αφορούν το δείγμα.

3.2.2.2. Προσδιορισμός γονιδίων και λειτουργιών

Τα λειτουργικά πρότυπα, που αποτελούν την απόκριση όλων των ζωντανών οργανισμών σε μια περιβαλλοντική θέση καθώς και οι συμβιωτικές ή ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις τους, ενσωματώνουν τον γενετικό τους κώδικα, όπου όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για λειτουργίες όπως η διατροφή, η χημειοταξία, η προσαρμογή σε εχθρικά περιβάλλοντα και ο πολλαπλασιασμός, κωδικοποιούνται με τη μορφή γονιδίων. Υπό αυτή την έννοια, η αναγνώριση των γονιδίων μέσα σε ένα γονιδίωμα, μέσω της κατάλληλης χαρτογράφησης κάθε γονιδίου στην αλληλουχία ή τις αλληλουχίες του, είναι ένα απαραίτητο βήμα, για τον σωστό λειτουργικό σχολιασμό του και την αποκρυπτογράφηση των υποκείμενων ρυθμιστικών μηχανισμών. Υπολογιστικά, η ανίχνευση γονιδίων μέσα σε ένα γονιδίωμα ξεκινά με την ανίχνευση

των ORF, μετά την αξιολόγηση τους εάν μπορούν να μεταφραστούν σε λειτουργικές πρωτεΐνες (έτσι ώστε οι αντίστοιχες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων να θεωρηθούν ως υποψήφια γονίδια που κωδικοποιούν). Οι αλγόριθμοι που εκτελούν αυτήν την αξιολόγηση, χρησιμοποιούν διάφορες μεθοδολογίες για την πρόβλεψη γονιδίων είτε από τον τομέα του machine learning είτε όχι, ενώ τα υποκείμενα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους, τροποποιούνται κριτικά ανάλογα με το εάν η πρόβλεψη γονιδίου στοχεύει προκαρυωτικούς ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Ακόμα κι αν όλες οι αλληλουχίες γονιδίων ενός μεταγονιδιωματικού πληθυσμού διακριθούν με επιτυχία, η αφθονία των πληροφοριών που περιέχουν δεν μπορεί να αξιοποιηθεί χωρίς τον κατάλληλο σχολιασμό της λειτουργίας τους. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος σχολιασμού μιας ακολουθίας γονιδίων είναι η μέτρηση της ομολογίας της (Altschul et al., 1990; Kent, 2002) με ήδη γνωστά γονίδια που λαμβάνονται από δημόσιες βάσεις δεδομένων. Ωστόσο, καθώς περισσότερο από το 99% των βακτηριακών ειδών δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο και η ποσότητα των μεταγονιδιωματικών δεδομένων που παράγονται κάθε χρόνο συνεχώς επεκτείνεται, αυτές οι μέθοδοι δεν επαρκούν πλέον για την πρόβλεψη της λειτουργίας των νέων γονιδίων. Αντίθετα, έχουν προκύψει νέες προγνωστικές προσεγγίσεις, που μετατρέπονται σε τυπική πρακτική για αυτού του είδους την ανάλυση, όπως οι τεχνικές Hidden Markov Models (Finn et al., 2011) και μεθοδολογίες machine learning (Tian et al., 2004) που αξιολογούν την ομοιότητα ακολουθίας, αξιοποιώντας ολόκληρη την περιοχή της αλληλουχίας, αναζητώντας προφίλ ή κίνητρα για οποιοδήποτε γνωστό γονίδιο με δεδομένη λειτουργικότητα αντί να δίνεται προτεραιότητα στη σειριακή ομολογία.

3.3. Κανονικοποίηση

Για λόγους σαφήνειας, ξεκινάμε ορίζοντας ορισμένους σημαντικούς όρους που χρησιμοποιούνται σε αυτή η εργασία και στη βιβλιογραφία. Η φράση απόλυτη αφθονία κάθε μικροοργανισμού ή ταξινομικής μονάδας (είδος, γένος, οικογένεια, τάξη, φύλο κλπ.) αναφέρεται στη μη παρατηρήσιμη πραγματική αφθονία σε μια μονάδα όγκου ενός οικοσυστήματος, όπως το έντερο. Αντίστοιχα, θα μπορούσε να οριστεί η απόλυτη σχετική αφθονία ενός ταξινομικού μεγέθους σε μια μονάδα όγκου ενός οικοσυστήματος, ως ο λόγος της απόλυτης αφθονίας του προς τη συνολική απόλυτη αφθονία όλων των ταξινομικών κατηγοριών σε μια μονάδα όγκου ενός οικοσυστήματος.

Ένα σημαντικό εμπόδιο για την εκτέλεση της ανάλυσης είναι το άγνωστο κλάσμα δειγματοληψίας που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα. Είναι κρίσιμο να ομαλοποιηθούν τα δεδομένα, ώστε να εξαιρεθεί κάθε προβληματισμός λόγω των διαφορών στα κλάσματα δειγματοληψίας. Έτσι, ο πρωταρχικός στόχος της κανονικοποίησης είναι να μετασχηματίσει τα παρατηρούμενα δεδομένα έτσι ώστε οι αναμενόμενες διαφορές στις μέσες απόλυτες αφθονίες μεταξύ δύο οικοσυστημάτων να μην επηρεάζονται από τις διαφορές στα κλάσματα δειγματοληψίας. Η αποτυχία κανονικοποίησης των δεδομένων θα έχει ως αποτέλεσμα τη συστηματική ροπή προς σφάλματα που αυξάνει το ποσοστό ψευδούς ανακάλυψης (False Discovery Rate - FDR).

Τα δεδομένα NGS είναι συνθετικά με την έννοια ότι ο συνολικός αριθμός των αναγνώσεων που ακολουθούνται για ένα δείγμα περιορίζεται σε ένα αυθαίρετο όριο που δεν έχει βιολογικό νόημα. Ενώ οι πιο παραδοσιακές προσεγγίσεις βασίζονται σε περίπλοκες διαδικασίες κανονικοποίησης για να κάνουν τις μετρήσεις ανάγνωσης συγκρίσιμες μεταξύ των δειγμάτων, το CoDA χρησιμοποιεί αναλογίες λογαριασμών και έτσι αποφεύγει τις υποθέσεις που συνοδεύουν την κανονικοποίηση.

Η μεγάλη μεταβλητότητα των συνολικών μετρήσεων ανά δείγμα αποτρέπει σημαντικές συγκρίσεις ακατέργαστων πληροφοριών για την ποσοτική εμφάνιση των μικροβίων του δείγματος. Αυτό, συνήθως, αντιμετωπίζεται μέσω της κανονικοποίησης των ακατέργαστων μετρήσεων πριν από την ανάλυση. (Calle M. L., 2019), (Sophie Weiss¹, Zhenjiang Zech Xu², Shyamal Peddada³, Amnon Amir², Kyle Bittinger⁴, Antonio Gonzalez², 2017, Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics.)

3.3.1. Ποικιλομορφία

Η ποικιλομορφία του μικροβιώματος είναι ένας σημαντικός δείκτης των καλών ή κακών συνθηκών του οικοσυστήματος, με τη μεγαλύτερη ποικιλότητα του μικροβιώματος να συνδέεται, συνήθως, με την καλύτερη κατάσταση της υγείας. Η ποικιλότητα του μικροβιώματος μπορεί να αξιολογηθεί μέσω πολλαπλών οικολογικών δεικτών που μπορούν να χωριστούν σε δύο είδη μετρήσεων, την ποικιλότητα Άλφα (Alpha) και Βήτα (Beta). Η ποικιλότητα άλφα μετρά τη μεταβλητότητα των ειδών σε ένα δείγμα, ενώ η ποικιλότητα βήτα ευθύνεται για τις διαφορές στη σύνθεση μεταξύ των δειγμάτων. Ένα μεγάλο σύνολο μέτρων ποικιλομορφίας παρέχεται από το πακέτο R vegan. (Calle M. L., 2019)

3.3.1.1. Άλφα ποικιλότητα

Το πιο σημαντικό μέτρο της ποικιλότητας Άλφα είναι ο πλούτος (richness), που ορίζεται ως ο αριθμός των διαφορετικών ειδών που υπάρχουν σε ένα περιβάλλον. Ο πλούτος υπολογίζεται από τον παρατηρούμενο πλούτο, δηλαδή τον αριθμό των διαφορετικών ειδών που παρατηρήθηκαν στο δείγμα. Ο παρατηρούμενος πλούτος τείνει να υποτιμά τον πραγματικό πλούτο στο περιβάλλον, όπου τα λιγότερο συχνά εμφανιζόμενα είδη ή όσα βρίσκονται σε χαμηλή περιεκτικότητα είναι πιθανό να μην ανιχνευθούν. Για αυτό υπάρχουν διαφορετικοί δείκτες που προσαρμόζονται και προσπαθούν να εκτιμήσουν το κρυφό τμήμα που δεν έχει εντοπιστεί. Ένας άλλος σημαντικός δείκτης της ποικιλότητας Άλφα είναι η ομαλότητα, η οποία μετρά την ομοιογένεια στην ποσότητα των διαφορετικών ειδών σε ένα δείγμα. (Calle M. L., 2019)

- Μέτρο πλούτου (richness): Δείκτης Chao1
- Μέτρο ομαλότητας (evenness): Δείκτης Shannon

3.3.1.2. Βήτα ποικιλότητα

Η Βήτα ποικιλομορφία μετρά τις διαφορές στη σύνθεση του μικροβιώματος μεταξύ των δειγμάτων. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα οικολογικών αποστάσεων ή διαφορών για τη μέτρηση πόσο κοντά βρίσκονται δύο μικροβιακές συνθέσεις.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι:

- Η απόσταση Bray-Curtis: Υποδηλώνει τη σχετική σύσταση και ποσότητα των μικροοργανισμών του μικροβιώματος δύο διαφορετικών δειγμάτων.
- Η απόσταση UniFrac: Εξετάζει το φυλογενετικό δέντρο που αντιπροσωπεύει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών ταξινομικών κατηγοριών. Το φυλογενετικό δέντρο μπορεί να ληφθεί με βιοπληροφορικά εργαλεία, όπως το mothur και το QIIME.
- Οι σταθμισμένες αποστάσεις UniFrac: μετρά το σχετικό μήκος εκείνων των κλάδων που οδηγούν αποκλειστικά σε είδη που υπάρχουν μόνο σε ένα από τα δύο δείγματα σε σχέση με το συνολικό μήκος όλων των κλάδων στο φυλογενετικό δέντρο των μικροβίων των δειγμάτων. (Calle M. L., 2019)

3.3.2. Τεχνικές κανονικοποίησης

Επειδή η κανονικοποίηση/εξομάλυνση έχει σκοπό να επιτρέψει την ουσιαστική σύγκριση δεδομένων από διαφορετικές μετρήσεις, είναι κρίσιμης σημασίας για την εγκυρότητα όλων των μεταγενέστερων αναλύσεων. Η σωστή κανονικοποίηση μπορεί ενδεχομένως να αφαιρέσει τις μεγάλες διακυμάνσεις και παραλλαγές που εισάγονται

από τη δειγματοληψία και τη διαδικασία αλληλούχισης, έτσι ώστε τα κανονικοποιημένα δεδομένα να αντικατοπτρίζουν, βιολογικά, τα υποκείμενα.

Οι βασικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

- **Καμία κανονικοποίηση:** Δεν εφαρμόζεται καμία διόρθωση για άνισα μεγέθη βιβλιοθήκης.
- **Αναλογία - Proportion:** Οι μετρήσεις σε κάθε στήλη κλιμακώνονται με το άθροισμα της στήλης.
- **Rarefy:** Σε κάθε στήλη εφαρμόζεται υποδειγματοληψία σε ομοιόμορφο βάθος χωρίς αντικατάσταση (υπεργεωμετρικό μοντέλο).
- **Ανώτερο τεταρτημόριο καταγραφής - logUQ:** Κάθε δείγμα κλιμακώνεται κατά το 75% της κατανομής του πλήθους του. Στη συνέχεια, οι μετρήσεις μετασχηματίζονται λογαριθμικά.
- **Αθροιστική κλιμάκωση αθροίσματος - CSS:** Αυτή η μέθοδος είναι παρόμοια με το logUQ, με τη διαφορά ότι το CSS επιτρέπει μια πιο ευέλικτη κατανομή του δείγματος. Μόνο το τμήμα της κατανομής πλήθους κάθε δείγματος που είναι σχετικά αμετάβλητο μεταξύ των δειγμάτων κλιμακώνεται με CSS. Αυτό επιχειρεί να μετριάσει την επίδραση μεγαλύτερων τιμών μέτρησης στην ίδια στήλη.
- **Σταθεροποίηση διακύμανσης (VS) - DESeqVS:** Για κάθε στήλη, ένας συντελεστής κλίμακας για κάθε OTU υπολογίζεται ως η τιμή του OTU διαιρούμενη με τον γεωμετρικό του μέσο όρο σε όλα τα δείγματα. Όλες οι αναγνώσεις για κάθε στήλη, στη συνέχεια, διαιρούνται με τη διάμεσο των παραγόντων κλιμάκωσης για αυτήν τη στήλη. Η διάμεσος επιλέγεται ώστε να αποτρέψει τα OTU με μεγάλες τιμές καταμέτρησης από το να έχουν αδικαιολόγητη επιρροή στις τιμές άλλων OTU. Έτσι, προκύπτει μια κατάλληλη σχέση μέσης διακύμανσης, χρησιμοποιώντας τις κλιμακούμενες μετρήσεις για όλα τα OTU και εφαρμόζοντας μια αρνητική διωνυμική κατανομή,. Αυτό προσαρμόζει τις μετρήσεις, έτσι ώστε η διακύμανση στις μετρήσεις ενός OTU στα δείγματα να είναι περίπου ανεξάρτητο από το μέσο όρο του.
- **Περιοσμένος μέσος όρος κατά M-Values - edgeR-TMM:** Ο συντελεστής κλιμάκωσης TMM υπολογίζεται ως ο σταθμισμένος μέσος όρος των αναλογιών

μεταξύ κάθε ζεύγους δειγμάτων, αφού εξαιρεθούν τα υψηλότερα πλήθη OTU και αυτά με τη μεγαλύτερη αλλαγή στην αναλογία τους (log-fold). Αυτό ομαλοποιεί τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, ελαχιστοποιώντας την αλλαγή στο log-fold για τα περισσότερα OTUs. Οι συντελεστές κλιμάκωσης TMM είναι, συνήθως, περίπου μονάδα, αφού η κανονικοποίηση TMM, όπως το DESeqVS, υποθέτει ότι η πλειονότητα των OTU δεν είναι διαφορετικά άφθονα. Οι παράγοντες ομαλοποίησης για κάθε δείγμα είναι το γινόμενο του παράγοντα κλιμάκωσης TMM και του αρχικού μεγέθους βιβλιοθήκης.

3.4. Ανάλυση διαφορικής αφθονίας μικροβίων μεταξύ δειγμάτων

Ένας αριθμός διαδικασιών έχουν εισαχθεί και χρησιμοποιηθεί στο βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της διαφορικής έκφρασης των αφθονιών των μικροβιακών μονάδων μεταξύ των δειγμάτων. Μια κοινή προσέγγιση είναι η εφαρμογή μιας μη παραμετρικής δοκιμής (πχ. το Mann – Whitney ή το Wilcoxon rank - sum τεστ για δύο κλάσεις δείγματος ή η δοκιμή Kruskal – Wallis για πολλαπλές κλάσεις δείγματος) μετά την κανονικοποίηση των πινάκων χαρακτηριστικών. Δυστυχώς, όμως, αυτές οι τυπικές, μη παραμετρικές δοκιμές δεν λαμβάνουν υπόψη τη δομή της σύνθεσης των δεδομένων του μικροβιώματος. (Lin H., 2020)

3.4.1. Μέθοδοι βασισμένες στην RNA-seq ανάλυση: edgeR και DESeq2

Στη βιβλιογραφία, έχουν προταθεί πολλά παραμετρικά μοντέλα με βάση μεταγραφικά δεδομένα ως εναλλακτικές σε τυπικές, μη παραμετρικές δοκιμές, όπως τα μοντέλα της RNA-Seq ανάλυσης, για την ανάλυση των διαφορών μεταξύ των ομαδοποιημένων δειγμάτων. Μεταξύ αυτών των εργαλείων, το DESeq2 και το edgeR είναι τα πιο δημοφιλή. Αυτές οι μέθοδοι μοντελοποιούν τις αφθονίες χρησιμοποιώντας αρνητική διωνυμική κατανομή, αφού πρώτα προχωρούν στην κανονικοποίηση των δεδομένων με τις αντίστοιχες μεθόδους κλιμάκωσης, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω, ώστε να λαμβάνονται υπόψη οι διαφορές στα κλάσματα δειγματοληψίας.

Παρόλα αυτά, ενώ και οι δύο μέθοδοι είναι γενικά πολύ λογικές και κατάλληλες για δεδομένα γονιδιακής έκφρασης, φαίνεται να μην αποδίδουν επαρκώς για δεδομένα μικροβιώματος. Αυτό οφείλεται, σε μεγάλο βαθμό, στο γεγονός ότι οι μέθοδοι κανονικοποίησης που χρησιμοποιούνται από αυτές τις δύο μεθόδους εγγενώς, υποθέτουν ότι ένα πολύ μικρό κλάσμα ταξινομήσεων είναι διαφορετικά εκφρασμένο. Αυτή η υπόθεση δεν είναι απαραίτητα έγκυρη για τα δεδομένα του μικροβιώματος.

Κατά συνέπεια, τα στατιστικά στοιχεία μιας δοκιμής που χρησιμοποιούνται από αυτές τις μεθόδους είναι εγγενώς προκατειλημμένα, βάσει της αρχικής υπόθεσης. Έτσι, όσο μεγαλύτερο είναι το περιεχόμενο ενός δείγματος, τόσο μεγαλώνει το ποσοστό ψευδούς ανακάλυψης (FDR). (Lin H., 2020)

3.4.2. MetagenomeSeq

Στη metagenomeSeq μέθοδο εφαρμόζεται ένα εναλλακτικό μοντέλο που βασίζεται στη Γκαουσιανή κατανομή των πολλών μηδενικών (zero-inflated Gaussian - ZIG), αντί του αρνητικού διωνυμικού μοντέλου. Είναι μια ισχυρή και ευέλικτη μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί για δεδομένα σε όλο το μήκος της αναλογίας του μικροβιώματος ή των δεδομένων μέτρησης που παράγονται είτε με τεχνολογίες αλληλουχίας 16S rRNA είτε shotgun. Μπορεί να περιλαμβάνει διάφορους τύπους σταθερών και τυχαίων επιδράσεων και να αντιπροσωπεύει διάφορες δομές συσχέτισης εντός του δείγματος και μπορεί να χειριστεί αποτελεσματικά τον μηδενικό πληθωρισμό, καθώς αυτός υπολογίζεται με μάζα πιθανότητας, και η Γκαουσιανή κατανομή μοντελοποιεί τις μη μηδενικές παρατηρούμενες αφθονίες.

Ωστόσο, αν και το metagenomeSeq έχει οριακά υψηλότερες δυνάμεις από τις περισσότερες από τις άλλες αντίστοιχες μεθόδους, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, υπόκειται σε αδικαιολόγητα υψηλά FDRs παρόλο που οι παρατηρούμενες αφθονίες κανονικοποιούνται από την ενσωματωμένη μέθοδο κλιμάκωσής τους (CSS). Επιπλέον, το πρόβλημα του μεγάλου αριθμού FDRs χειροτερεύει όταν το μέγεθος του δείγματος ή το μέγεθος του αποτελέσματος αυξάνεται (δηλαδή διπλασιάζεται μεταβολή των μέσων απόλυτων αφθονιών). Αξίζει, επίσης, να επισημανθεί ότι το metagenomeSeq είναι η μόνη μέθοδος, μεταξύ όλων των παραμετρικών μοντέλων, που αυξάνει το FDR όταν εφαρμόζεται σε rarefied αρχεία (αρχεία με πολλά σπάνια ή σε πολύ μικρό αριθμό μικρόβια). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο μοντέλο της μεθόδου που απαιτεί την εισαγωγή συγκεκριμένων μεγεθών βιβλιοθήκης για την καταγραφή των μηδενικών αναλογιών. (Lin H., 2020)

3.4.3. ALDEx2

Το ALDEx2 σχεδιάστηκε για να αναγνωρίζει διαφορικές αφθονίες χαρακτηριστικών (γονίδια, μικροβιακών μονάδων ή γονιδιωματικών τμημάτων), σε σχέση με το γεωμετρικό μέσο (median) της αφθονίας, μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων δειγμάτων. Όπως αναφέρεται και σε μελέτες προσομοίωσης, το ALDEx2 όχι μόνο υπερβαίνει, συνήθως, το ονομαστικό επίπεδο FDR (5%), αλλά έχει, επίσης, σημαντικά

μικρότερη ισχύ σε σύγκριση με άλλες ανταγωνιστικές αντίστοιχες μεθόδους. (Lin H., 2020)

3.4.4. ANCOM

Η ανάλυση της σύστασης των μικροβιωμάτων (ANCOM) βασίζεται στην ALR μεθοδολογία, η οποία λαμβάνει υπόψη τη δομή της σύνθεσης του δεδομένου μικροβιώματος και προχωράει στην αντικατάσταση των μηδενικών τιμών με αναλογίες επί της βιβλιοθήκης, κάτι που επηρεάζει, όμως, την ποικιλομορφία του δείγματος και, άρα, του αποτελέσματος.

Η μέθοδος ANCOM ελέγχει με επιτυχία το FDR διατηρώντας το κάτω από το ονομαστικό επίπεδο (5%) ενώ διατηρεί και επαρκή ισχύ. Ωστόσο, η ANCOM μπορεί να είναι υπολογιστικά εντατική μέθοδος αφού για κάθε ταξινομική μονάδα, εκτελεί ALR μετασχηματισμό, χρησιμοποιώντας όλες τις υπόλοιπες. Ο χρόνος υπολογισμού κλιμακώνεται τετραγωνικά με τον αριθμό των ταξινομικών μονάδων. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση και, κυρίως, η απόφαση που λαμβάνεται από την ANCOM είναι δύσκολα ερμηνεύσιμη, πολλές φορές, από τους ερευνητές. (Lin H., 2020)

3.4.4.1. ANCOM-BC

Η μέθοδος της ανάλυσης συνθέσεων μικροβιωμάτων με διόρθωση της πιθανότητας λάθους (μεροληψίας) μοντελοποιεί τις παρατηρούμενες αφθονίες χρησιμοποιώντας μια βάση μετατόπισης λογαριθμικού-γραμμικού μοντέλου.

Αυτό το μοντέλο ελέγχει την υπόθεση σχετικά με τη διαφορική απόλυτη αφθονία της μονάδας κατά την εκτίμηση των κλασμάτων δειγματοληψίας για συγκεκριμένα δείγματα και διορθώνει κατάλληλα την πιθανότητα σφάλματος. Όπως αποδεικνύεται σε μελέτες προσομοίωσης, το ANCOM-BC όχι μόνο ελέγχει πολύ καλά το FDR, αλλά και ανταγωνίζεται πολύ καλά άλλες μεθόδους από άποψη ισχύος. Επιπλέον, σε αντίθεση με οποιαδήποτε από τις υπάρχουσες μεθόδους, η ANCOM-BC παρέχει έγκυρα διαστήματα εμπιστοσύνης για τη διαφορική αφθονία επιμέρους μονάδων μεταξύ δύο ομάδων μελέτης και παρέχει επίσης έγκυρη τιμή p-value. Δεδομένου ότι έχει ένα πλαίσιο γραμμικής παλινδρόμησης, δίνει τη δυνατότητα για τη διενέργεια επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, καθώς και προσαρμογών. Το ANCOM-BC μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει μοτίβα της διαφορικής αφθονία σε διαφορετικές ομάδες μελέτης όπως μελέτες σε βάθος χρόνου ή δόσης-απόκρισης. (Lin H., 2020)

3.4.5. Voom

Η μοντελοποίηση της διακύμανσης σε επίπεδο παρατήρησης με το εργαλείο Voom, ορίζει πως τα μεγέθη της βιβλιοθήκης κλιμακώνονται με τη χρήση των μετρήσεων καταγραφής του edgeR, ανά εκατομμύρια (cpm) παράγοντες κανονικοποίησης. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται η μέθοδος LOWESS για την ενσωμάτωση της μέσης διακύμανσης στα βάρη ακριβείας για κάθε OTU.

3.5. Προκλήσεις και προοπτική

Σήμερα, αναγνωρίζουμε την ανάγκη μελέτης του ανθρώπινου μικροβιώματος ως ένα ολόκληρο οικοσύστημα που μας βοηθά να κατανοήσουμε καλύτερα τη σχέση μεταξύ της μικροχλωρίδας και της υγείας ή της ασθένειας του ξενιστή. Η μεταγονιδιωματική είναι ένα σχετικά νέο αλλά ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο στην περιβαλλοντική βιολογία, που στοχεύει στην απόκτηση γνώσεων για τα γονιδιώματα των περιβαλλοντικών μικροβίων καθώς και ολόκληρων μικροβιακών κοινοτήτων (πχ. μικροχλωρίδα του εντέρου). Με τις τεχνολογίες αλληλούχισης να βελτιώνονται σταθερά, η δημιουργία μεγάλων ποσοτήτων μεταγονιδιωμάτων γίνεται ρουτίνα. Γι' αυτό το λόγο, απαιτούνται ισχυρές μεθοδολογίες για την ολοκληρωμένη ανάλυση των οικοσυστημάτων, με τις μεταγονιδιωματικές προσεγγίσεις να είναι καθοριστικές για την περαιτέρω ανάλυση του ανθρώπινου μικροβιώματος. Ωστόσο, οι εξωτερικές επιρροές, καθώς και η μεθοδολογική και δειγματοληπτική μεροληψία και οι διαφοροποιήσεις, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην ερμηνεία των δεδομένων.

Λόγω της στενής σχέσης μεταξύ του μικροβιώματος και της υγείας και την ύπαρξη τυπικών βιοδεικτών διαφορετικών παθολογιών, η πρόταση να τροποποιήσουμε τη μικροχλωρίδα ακούγεται λογική από θεραπευτική άποψη. Αυτή η κατεύθυνση ανοίγει το δρόμο στην εφαρμογή της μεθόδων εξατομικευμένης ιατρικής και θεραπείας, πράγμα που θα συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση ασθενειών και τη μείωση των παρενεργειών. Αυτό, πέρα από την επιστημονική και ερευνητική διάσταση, ανοίγει και δρόμους στη βελτίωση της καθημερινότητάς και του επιπέδου ζωής των κοινωνιών.

Στο μέλλον, αυτού του είδους η προσέγγιση (δηλαδή, η μεταγονιδιωματική) θα εντοπίζει βιοδείκτες ευημερίας που αντιστοιχούν σε μια γενική και πιο ισορροπημένη μικροχλωρίδα. Επιπλέον, η μεταγονιδιωματική μπορεί να μας δώσει μια καλύτερη

κατανόηση της σχέσης μεταξύ του ανθρώπου και του μικροβιώματός του, καθώς και του ρόλου αυτής της αλληλεπίδρασης με την υγεία του ανθρώπου.

Ωστόσο, παραμένει δύσκολο να συνδεθούν συγκεκριμένες μικροβιακές φυλές με συγκεκριμένες λειτουργίες στο περιβάλλον. Ένας αριθμός προσεγγίσεων «λειτουργικής μεταγονιδιωμικής» έχει εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια που επιτρέπουν τη γονιδιωμική ανάλυση υψηλής ανάλυσης ακαλλιέργητων μικροβίων, συνδέοντάς τα με συγκεκριμένες λειτουργίες στο περιβάλλον. Οι τομείς των *metatranscriptomics* και *metaproteomics* είναι οι νεότεροι επιμέρους κλάδοι στο πεδίο της μεταγονιδιωμικής που παρέχουν περαιτέρω επίπεδα ανάλυσης για λειτουργική ανάλυση ακαλλιέργητων μικροβίων και κοινοτήτων. Η εμφάνιση νέων (επόμενης γενιάς) τεχνολογιών αλληλουχίας, με αποτέλεσμα υψηλότερη απόδοση αλληλούχισης και δραματική πτώση στην τιμή της, θα καθορίσει μια νέα εποχή στη μεταγονιδιωμική. Αυτή τη στιγμή, η προσπάθεια αλληλούχισης θα μεταφερθεί σε ένα νέο επίπεδο για να επιτρέψει την αντιμετώπιση νέων, προηγουμένως ανέφικτων βιολογικών ερωτημάτων, καθώς και την επιτάχυνση της ανακάλυψης, με βάση το μεταγονιδίωμα, νέων ιατρικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

Βιβλιογραφία

1. Malard F., Dore J., Gaugler B., Mohty M., (2021), Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunology*, 14, 547–554.
2. Sekirov I., Russell S. L., Caetano L., Antunes M., Finlay B. B., (2010), Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*, 90, 859–904.
3. Μεντής Α., Γύπας Φ., (2013), Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου. Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο, *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 30, 272-288.
4. Kotzampassi K., Giamarellos-Bourboulis E. J., Stavrou G., (2015), Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. *International Scholarly Research Notices*.
5. Fava F., Rizzetto L., Tuohy K. M., (2019), Gut microbiota and health: connecting actors across the metabolic system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 78, 177–188.
6. Mukhopadhyay I., Segal J. P., Carding S. R., Hart A. L., Hold G. L., (2019), The gut virome: the ‘missing link’ between gut bacteria and host immunity. *Therap Adv Gastroenterol*.
7. Grigg J. B., Sonnenberg G. F., (2017), Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases. *J Immunol*, 198, 564-571.
8. Perez J. C., (2021), Fungi of the human gut microbiota: Roles and significance. *International Journal of Medical Microbiology*, 311.
9. Mach T., (2006), CLINICAL USEFULNESS OF PROBIOTICS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, Suppl 9, 23-33.
10. Wu K., (2018), It Takes Guts: The Power of Your Gut Microbiota. *SITN Boston, YouTube*. https://www.youtube.com/watch?v=GCfp08b5_DY.
11. Zeng M. Y., Inohara N., Nuñez G., (2017), Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*, volume 10, pages 18–26.
12. Brüssow H., (2020), Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Thematic Issue on Synthetic Microbiology, Volume 13, pages 423-434*.
13. Patyar S., Joshi R., Prasad Byrav DS., Prakash A., Medhi B., Das BK., (2020), Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *Journal of Biomedical Science volume 17, Article number: 21*.
14. Bharti R., Grimm D. G., (2021), Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in Bioinformatics*, 22(1), pages 178–193.
15. Winand R., Bogaerts B., Hoffman S., Lefevre L., Delvoeye M., Van Braekel J., Fu Q., Roosens N. HC., De Keersmaecker S. CJ, Vanneste K., (2019), Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences, Published: 31 December 2019*.
16. Lehtinen I., (2018), Comparison of normalization and statistical testing methods of 16S rRNA gene sequencing data. *School of Science. Thesis submitted for examination for the degree of Master of Science in Technology*.
17. Wu W.-K., Chen C.-C., Panyod S., Chen R.-A., Wu M.-S., Sheen L.-Y., Chang S.-C., (2019), Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118, 545-555.
18. Jovel J., Patterson J., Wang W., Hotte N., O’Keefe S., Mitchel T., Perry T., Kao D., Andrew L. Mason, Madsen K. L., Wong G. K.-S., (2016),

Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics.
Frontiers in Microbiology,
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00459/full?report=reader>.

19. Peabody M. A., Van Rossum T., Lo R., Brinkman F. S. L., (2015), Evaluation of shotgun metagenomics sequence classification methods using in silico and in vitro simulated communities. *BMC Bioinformatics volume 16, Article number: 362.*
20. Kim D., Hofstaedter C. E., Zhao C., Mattei L., Tanes C., Clarke E., Lauder A., Sherrill-Mix S., Chehoud C., Kelsen J., Conrad M., Collman R. G., Baldassano R., Bushman F. D., Bittinger K., (2017), Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome volume 5, Article number: 52.*
21. Lin H., Das Peddada S., (2020), Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis. *npj Biofilms and Microbiomes, 6, 60.*
22. Boulund F., Pereira M. B., Jonsson V., Kristiansson E., (2018), Computational and Statistical Considerations in the Analysis of Metagenomic Data. *Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications, Chapter 4, p. 81-102.*
23. Calle M. L., (2019), Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics Inform, 17.*
24. Vera Odintsova V., Alexander Tyakht A., Alexeev D., (2017), Guidelines to Statistical Analysis of Microbial Composition Data Inferred from Metagenomic Sequencing. *Curr. Issues Mol. Biol. 2017, 24(1), 17-36.*
25. Sophie Weiss¹, Zhenjiang Zech Xu², Shyamal Peddada³, Amnon Amir², Kyle Bittinger⁴, Antonio Gonzalez², 2017, *Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics.*
26. Lozupone C., Zaneveld J. R., Vázquez-Baeza Y., Birmingham A., Hyde E. R., Knight R., (2017), Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Weiss et al. Microbiome, 5, 27.*
27. Yuan C., Lei J., Cole J., Sun Y., (2015), Reconstructing 16S rRNA genes in metagenomic data. *Bioinformatics, Volume 31, pages i35–i43.*