

**Pro gradu -tutkielma**

**Tulehduksen ja suolistomikrobiston merkitys  
paksusuolensyövän puoleisuuserossa**

**Jenni Lainio**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

09.04.2024

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Solu- ja molekyylibiologian maisteriohjelma

Lainio, Jenni Tulehduksen ja suolistomikrobiston merkitys  
paksusuolensyövän puoleisuuseroissa  
Pro gradu tutkielma: 50 s.  
Työn ohjaajat: Dosentti Satu Pekkala ja Professori Marja Tirola  
Tarkastajat: Suvi Ruuskanen Apulaisprofessori ja Mervi T.  
Hyvönen Dosentti.

Huhtikuu 2024

---

Hakusanat: CCL2, flagella, IL-6, MCP-1, mikrobiomi, oikeanpuoleinen kasvain, TLR5, vasemmanpuoleinen kasvain

Paksusuolensyöpää pidetään elämäntapasairautena, se on kolmanneksi yleisin syöpätyyppi maailmanlaajuisesti. Paksusuolensyövän kasvaimet jaetaan joko vasemman- tai oikeanpuoleisiin, riippuen missä paksusuolen osassa ne sijaitsevat. Suurin osa kasvaimista on vasemmanpuoleisia, mutta oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla on huonompi ennuste. Kasvaimissa on havaittu puoleisuuseroja muun muassa mikrobiston koostumuksessa ja tulehdustilassa. Oikeanpuoleisiin kasvaimiin liittyy useammin myös vakavia tulehdustiloja ja niissä on havaittu runsasta mikrobikerrostuman eli biofilmin muodostusta. Biofilmin tiedetään lisäävän sytokiinien CCL2/MCP-1 ja Interleukiini-6:n määrää. Tarkkoja syitä kasvainten puoleisuuseroille ei kuitenkaan tiedetä, joten tässä tutkielmassa tutkittiin edelleen puoleisuuseroja suoliston mikrobikoostumuksessa ja tulehdustekijöiden ilmentymisessä. Aineisto kerättiin kahdeksalta Keski-Suomen sairaanhoitopiirin kirurgian yksilössä leikattavilta potilailta, jotka vapaaehtoisesti rekrytoitiin SUOPA-tutkimukseen, jota Pro gradu -tutkielma on osana. Potilaiden ulostenäytteistä ja kasvaimista analysoitiin mikrobikoostumus sekvensoimalla bakteerien 16S rRNA -geeni. Sytokiinien ja Tollin-kaltaisen reseptori 5:n geeniekspressio määritettiin kasvainnäytteistä kvantitatiivisella PCR:llä. Tilastolliset analyysit suoritettiin geeniekspression osalta SPSS-ohjelmistolla ja mikrobikoostumuksen osalta CLC Microbial Genomics -ohjelmistopakettilla. Pieni otoskoko osoittautui tilastollisesti haastavaksi, joten geeniekspression suhteen puoleisuuseroissa ei havaittu merkitsevää ero. Merkittävä ero havaittiin kasvainnäytteissä yhden bakteerilahkon, *Clostridiales* ( $p=0,02$ ), sekä viiden bakteerisuvun; *Family XIII AD3011 group* ( $p=0,05$ ), *Roseburia* ( $p=0,02$ ), *Ruminiclostridium 9* ( $p=0,03$ ) sekä neljän *Asteroleplasma* ( $p=0,02$ ;  $p=0,03$ ;  $p=0,04$  &  $p=0,05$ ) ja kahden *Christensenellaceae R-7 group* ( $p=0,03$  &  $p=0,04$ ) -suvulle kuuluvan OTU:n suhteen. Suurin osa bakteereista kuuluu firmikuuttien pääjaksoon, jonka määrän tiedetään kohonneen paksusuolensyövän potilailla. Merkittävät bakteerit esiintyvät oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla runsaimpina, mutta tutkimuksissa ne linkittyvät suurempaan esiintyvyyteen vasenpuoleisen kasvaimen potilailla, tosin kaikkien roolia suolistossa ja paksusuolensyövässä ei

ole yhtä hyvin tutkittu. Aineiston ollessa pieni, tulevaisuudessa havaintoja tulisi tutkia suuremmalla määrällä.



# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Paksusuolensyöpä .....	2
1.1.1	Paksusuolensyövän kasvainten puoleisuus.....	3
1.2	Suolisto mikrobisto.....	4
1.2.1	Suolistomikrobit paksusuolensyövässä.....	6
1.3	Tulehdus ja paksusuolensyöpä.....	7
1.3.1	Tulehdus ja suolistomikrobisto.....	9
1.4	Tutkielman tavoitteet .....	9
<b>2</b>	<b>AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>10</b>
2.1	Aineisto .....	10
2.2	Menetelmät .....	10
2.2.1	Mikrobianalyysi .....	12
2.2.2	Tulehdusanalyysit.....	14
2.2.3	Aineiston tilastollisen käsittely .....	16
<b>3</b>	<b>TULOKSET</b> .....	<b>16</b>
3.1	Suolistomikrobiston analyysit .....	16
3.1.1	Kasvainnäytteiden mikrobikoostumus.....	21
3.1.2	Ulostenäytteiden mikrobikoostumus.....	24
3.2	Tulehdusanalyysit .....	27
<b>4</b>	<b>TULOSTEN TARKASTELU</b> .....	<b>27</b>
4.1	Oikeanpuoleiset kasvaimet .....	28
4.2	Vasemmanpuoleiset kasvaimet .....	29
4.3	Kasvainnäytteiden merkittävästi eroavat mikrobit .....	31
4.4	Tulehdusanalyysit .....	33
<b>5</b>	<b>PÄÄTELMÄT</b> .....	<b>33</b>
	<b>KIITOKSET</b> .....	<b>35</b>
	<b>KIRJALLISUUSLUETTELO</b> .....	<b>36</b>

## SANASTO JA LYHENTEET

### Sanasto

<b>Adenooma</b>	Hyvälaatuinen kasvain rauhaskudoksessa
<b>Biofilmi</b>	Järjestäytynyt bakteerikerrostuma
<b>Flagelliini</b>	Bakteerisiiman rakenneproteiini
<b>Mikrobiomi</b>	Mikrobien yhteisö suolistossa
<b>Neoplasia</b>	Kasvaimen muodostuminen
<b>Proliferaatio</b>	Lisääntynyt solukasvu

### Lyhenteet

<b>CCL2/MCP-1</b>	kemokiini (C-C-motiivi) ligandi 2 (eng. <i>CC chemokine ligand 2</i> ) / monosyytti kemoattraktiivinen proteiini-1 (eng. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
<b>IL</b>	interleukiini
<b>MMR</b>	DNA:n kopiovirheen oikolukuprosessi (eng. <i>mismatch repair</i> )
<b>MSI</b>	mikrosatelliitti-instabiliteetti (eng. <i>microsatellite instability</i> )
<b>PSS</b>	paksusuolensyöpä
<b>TLR</b>	Tollin kaltainen reseptori (eng. <i>Toll-like receptors</i> )

# 1 JOHDANTO

Päivitetyn Maailman terveysjärjestön (eng. *World Health Organization*, WHO) julkaisema IARC World Cancer -raportin (2020) mukaan vuonna 2018 maailmanlaajuisesti paksusuolensyöpää (PSS) (eng. *colorectal cancer*) sairasti 1,85 miljoonaa ihmistä, se on kolmanneksi yleisin syöpätyyppi niin miehillä kuin naisilla. Vuonna 2018 kuolleisuus PSS:ään oli toiseksi suurin syy syöpäkuolemista, 881 000 kuoleamalla (Senore ym. 2020).

PSS:ää pidetään elämäntapasairautena, sillä sairauden riski on suuri maissa, joiden inhimillisen kehityksen indeksi (eng. *human development index*, HDI) on korkea tai hyvin korkea. Suurin osa näistä maista luokitellaan niin sanotusti ”kehittyneiksi” maiksi (Bray 2014). Sairastavuutta esiintyykin eniten länsimaalaisissa maissa, kuten Australiassa ja Euroopassa, näillä mantereilla kuolleisuus on kuitenkin matala verrattuna esiintyvyyteen. Yhtenä syynä on se, että maiden terveydenhuolto mahdollistaa sairauden hoidon ja löytymisen riittävän varhaisessa vaiheessa (Senore ym. 2020, Soerjomataram ja Bray 2020). Tapausten määrä onkin pysähtynyt tai jopa laskenut seulonnan takia yli 55-vuotiaalla väestöllä; esimerkiksi Yhdysvalloissa, Australiassa ja Kanadassa. Tästä huolimatta korkean HDI:n maissa esiintyvyyksiluvut ovat pysyneet korkeimpina (Arnold ym. 2017, Soerjomataram ja Bray 2020). Tapausten määrän on myös huomattu nousevan nuoremmilla ikäpolvilla tietyissä korkean HDI:n maissa, kuten Japanissa, Turkissa ja Costa Ricassa (Soerjomataram ja Bray 2020); myös Euroopassa 20–49 ikäluokan ihmisillä PSS:n esiintyvyys on lisääntynyt (Vuik ym. 2019). Pienimmät luvut sairastavuudessa on Länsi-Afrikan maissa (Ferlay ym. 2014).

Kuolleisuus suhteutettuna esiintyvyyteen on suuri maissa, jotka ovat siirtymävaiheessa, läpikäyden sosioekonomista kehitystä. Näissä maissa, kuten monissa Latinalaisen Amerikan valtioissa, omaksutaan länsimaalaisia elämäntapoja, mutta valtioiden rajoitettu terveydenhuolto ei pysty tarjoamaan syövän varhaista havaitsemista tai riittävää hoitoa (Senore ym. 2020).

Suomessa PSS:ään sairastuu vuosittain keskimäärin 1127 naista ja 1117 miestä. Suurin riski sairastua on 80–84-vuotiailla miehillä, suurimmillaan riski kuolla PSS:ään on myös miehillä, jotka ovat yli 85-vuotiaita. Keskimäärin vuosittain Suomessa PSS:ään kuolee 430 naista ja 428 miestä (Syöpärekisteri 2020).

On tiedetty jo pitkään, että ruokavalio vaikuttaa riskiin sairastua PSS:ään. Tabung ym. (2012) tunnistivat kaksi pääasiallista ruokavaliotyyppiä analysoidessaan tutkimuksia pääkomponenttianalyysillä (eng. *principal components analysis*, PCoA), mitkä joko lisäävät tai laskevat sairastumisen riskiä. Matalamman riskin ruokavaliotyyppi, eli niin sanottu terveellinen ruokavalio, koostuu pitkälti täysjyväviljasta, kasviksista ja hedelmistä, linsseistä, pähkinöistä, kalasta ja muista meren antimista sekä maidosta ja maitotuotteista. Ruokavaliotyyppi, joka johtaa kohonneeseen PSS:n riskiin eli epäterveelliseksi

kutsuttu ruokavalio, sisältää paljon prosessoitua ja punaista lihaa, puhdasta viljaa, sokerilla makeutettuja juomia, jälkiruokia sekä perunaa. Riski suurenee myös, kun elämäntapaan kuuluu paljon istumista ja vähän fyysistä aktiivisuutta. Ylipaino, lihavuus ja tyyppin 2 diabetes ovat myös PSS:n riskitekijöitä (Johnson ym. 2013, Pearson-Stuttard ym. 2018).

Tutkimuksissa on yhä enemmän saatu viitteitä, että suolistossa elävillä mikrobeilla on myös oma merkityksensä PSS:ssä (Kohoutova ym. 2014, Gao ym. 2015, Wirbel ym. 2019). On selvää, että PSS:ssä suoliston mikrobien yhteisö eli mikrobiomi (eng. *microbiota*) on erilainen verrattuna terveisiin yksilöihin populaation sisällä, sillä terveen mikrobiomin koostumukseen vaikuttaa myös maantieteellinen (Yatsunenko ym. 2012, He ym. 2018) sekä geneettinen (Lopera-Maya ym. 2022) tausta. Poikkeava suoliston mikrobisto eli dysbioosi ja pitkään jatkunut krooninen tulehdus, joka on tulehduksellisten suolistosairauksien (eng. *inflammatory bowel diseases, IBD*); haavaisen koliitin ja Crohnin taudin; oireita (Bernstein ym. 2001, Jess ym. 2012, Jussila ym. 2013), ovatkin PSS:ään yhdistettäviä tekijöitä (Wu ym. 2013, Gao ym. 2015). On tunnistettu, että dysbioosi johtuu valtaosassa tapauksissa joistakin patogeenisistä tai patogeenisyyteen liittyvistä (eng. *pathogen-associated*) bakteerisuvuista, joiden määrä suolistossa on lisääntynyt. Näihin lukeutuvat myös suun patogeenisia bakteerisukuja, joita terveessä suolistossa ei yleisesti esiinny (Flemer ym. 2017, Thomas ym. 2019). Suolistomikrobisto on hyvin dynaaminen ja sen tasapainon muutoksiin voivat vaikuttaa lisäksi muun muassa ruokailutottumukset, vanheneminen sekä terveydentilan vaihtelut (Claesson ym. 2011, David ym. 2014, Yeoh ym. 2021).

## 1.1 Paksusuolensyöpä

Perinnölliset ituratamutaatiot tai yksilölle kehittyvien kudossolujen somaattiset mutaatiot altistavat syövälle. Syöpä kehittyy paksusuolella järjestyksessä esiintyvien geneettisten vinoumien takia. PSS:n esimerkillinen kehityksen malli on, että kiinteät kasvaimet kehittyvät pettäneestä DNA:n kopiovirheen korjausjärjestelmästä, niin kutsutusta oikolukuprosessista (eng. *mismatch repair, MMR*) tai kromosomaalisesta epävakaudesta (eng. *chromosomal instability, CIN*), jolloin somaattiset mutaatiot ja epigeneettiset muutokset kasautuvat (Shivdasani 2020). MMR:n suhteen PSS:n kasvaimet voidaan jakaa kahteen ryhmään; MMR, joka on riittämätön (eng. *deficient*) korjaamaan DNA virheitä (dMMR) ja MMR, joka toimii normaalisti (eng. *proficient*) (pMMR). Seurauksena mikrosatelliitti-instabiliteetti (MSI) on joko korkea (eng. *high*) (dMMR–MSI-H) tai matala (eng. *low*) (pMMR–MSI-L). Näiden kasvaimien geneettinen profiili ja proteiinin tuotanto eroavat, mikä vaikuttaa muun muassa immunoterapiaan (Ganesh ym. 2019).

Lähes kaikki PSS:n kasvaimet saavat alkunsa, kun suolen normaalissa epiteelikudoksessa tapahtuu mutaatio portinvartijageenissä (eng. *gatekeeper gene*), joka PSS:ssä yleensä on inaktivoitunut APC-geeni (*adenomatous polyposis coli*). Se on merkittävä  $\beta$ -kateniinin hajottamisessa solussa. Ilman toimivaa APC-



proteiinia,  $\beta$ -kateniinin konsentraatio solussa kasvaa, jolloin se siirtyy tumaan, jossa se edistää solun lisäkasvua eli proliferaatiota (eng. *proliferation*) (Kinzler ja Vogelstein 1996, Jones ym. 2008). Tämä saa aikaan kudostyypin, jossa solut ovat epänormaaleja ja niiden järjestys on poikkeava, eli dysplasian (Lyly 2011, Brennan ja Garrett 2016). Seurauksena on hyvälaatuisen rauhaskasvaimen eli adenooman kehitys. Seuraava mutaatio *BRAF*- tai *KRAS*-geenissä kasvattaa adenooman suuruutta  $>1$  cm (Vogelstein ym. 1988, Jones ym. 2008). Pahalaatuisia piirteitä ja adenooman muuttumisen pahalaatuiseksi kasvaimeksi eli adenokarsinoomaksi seuraa, esimerkiksi *TP53*- (Baker ym. 1989), *PIK3CA*- (Samuels ja Velculescu 2004) ja *SMAD4*-onkogeneenien takia (Jones ym. 2008). Tässä vaiheessa kasvain tunkeutuu limakalvon alaiseen kudokseen (Brennan ym. 2016). Arvioidaan, että 40 % PSS:n kasvaimista kehittää etäpesäkkeiden muodostusta eli metastasointia, joista 80 % esiintyy maksassa (Manfredi ym. 2006, Tsikitis ym. 2014).

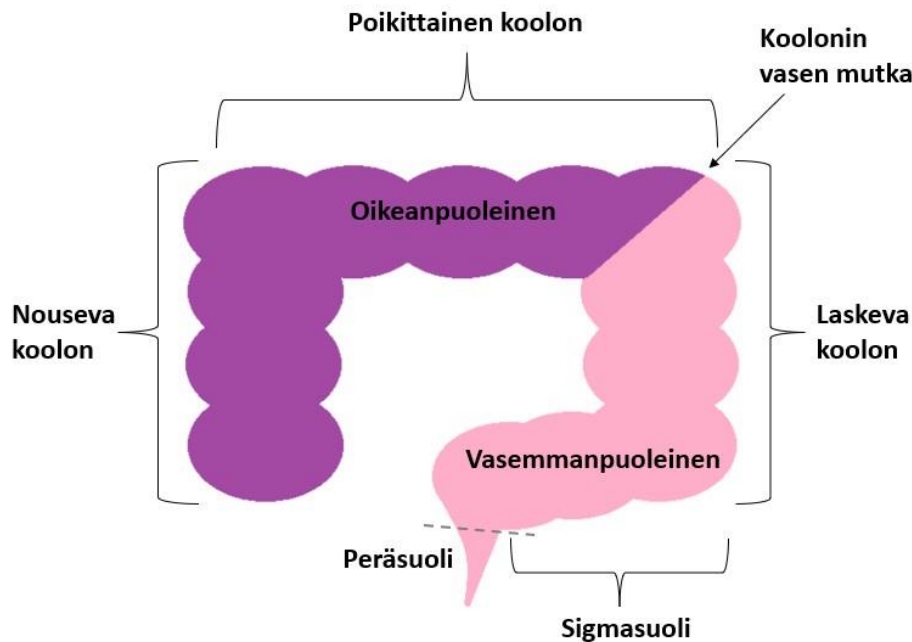
### 1.1.1 Paksusuolensyövän kasvainten puoleisuus

Paksusuolen puoleisuus on erotettavissa biologisesti (Iacopetta 2002) jo paksusuolen eli koolonin terveessä kudoksessa muun muassa geeniekspression (Glebov ym. 2003) ja DNA-metylaation (Menigatti ym. 2009, Kaz ym. 2014) suhteen. Tähän voi olla syynä se, että nouseva koolon ja noin kaksi kolmasosaa poikittaisesta koolonista kehittyvät sikiöaikana alkion suolen keskiosasta (eng. *midgut*). Loppu osa eli yksi kolmasosa poikittaisesta koolonista, laskeva koolon sekä sigmasuoli ja peräsuoli kehittyvät alkion suolen alaosasta eli takasuolesta (eng. *hindgut*) (Schoenwolf ym. 2015). Paksusuolenkasvaimet luokitellaankin siten oikeanpuoleisiksi (eng. *proximal*), kun ne sijaitsevat suolessa ennen koolonin vasenta mutkaa ja mutkan jälkeiset vasemmanpuoleisiksi (eng. *distal*) (kuva 1) (Beart ym. 1983, Bufill 1990, Stintzing ym. 2017). On kuitenkin hyvä huomioida, että paksusuolen syöpä ja peräsuolen syöpä ovat kaksi eri sairautta (Kneis ym. 2023).

Kasvaimissa on huomattu puoleisuuseroja muun muassa molekyylibiologiassa, mikrobikoostumuksessa sekä mutaatioprofiilissa (Bufill 1990, Gao ym. 2015, Lan ym. 2015). Oikeanpuoleisiin kasvaimiin on yhdistetty runsas DNA:n hypermetylaatio (eng. *CpG island methylator phenotype-high*, CIMP-H), MSI-H sekä *BRAF*-mutaation suurempi esiintyminen samanaikaisesti (Barault ym. 2008). Oikeanpuoleisissa kasvaimissa ilmeneekin yleisimmin viallisen MRR:n aiheuttamat DNA-replikaatio virheet (Kim ym. 1994) ja suurempi määrä onkogeneenisia muutoksia (Yaeger ym. 2018). Patel ym. (2018) havaitsivat oikeanpuoleisissa kasvaimissa myös yleistyneen tulehdusreaktion ja T-solujen lisääntyvyyden.

Vasemmanpuoleisissa kasvaimissa on runsaammin *TP53*- ja *APC*-mutaatioita (Yaeger ym. 2018), yleisempää on myös korkea-CIN (eng. *CIN-high*), jolloin *KRAS*-mutaation esiintyvyys saattaa olla korkeampi (Wielandt ym. 2020). Mutaatiot *KRAS*-geenissä jakautuvat kuitenkin tasaisemmin kasvainten puoleisuudessa (Hutchins ym. 2011). Tarkkoja syitä puoleisuuseroille ei tiedetä. Todetuista kasvaimista yli puolet ovat

vasemmanpuoleisia (Hemminki ym. 2010), oikeanpuoleisilla on todettu olevan huonompi ennuste (Wong 2010, Loupakis ym. 2015).



Kuva 1. Paksusuolensyövän kasvaimet luokitellaan oikean- tai vasemmanpuoleisiksi. Kasvaimet ennen koolonin vasenta mutkaa ovat oikeanpuoleisia ja mutkan jälkeiset vasemmanpuolen kasvaimia. Katkoviiva kuvastaa sitä, että paksusuolen syöpä ja peräsuolen syöpä ovat eri sairauksia (Stingzing ym. 2017, Kneis ym. 2023).

## 1.2 Suolisto mikrobisto

Ruoansulatuskanavassa esiintyy mikrobeja koko sen pituudelta. Suussa ja nielussa on omat bakteerinsa (Aas ym. 2005, Andersson ym. 2008). Ruokatorvi ei ole kovin monimuotoinen bakteerisukujen suhteen ja mahalaukun bakteerisuvut ovat suurelta osin samoja, kuin suun ja ruokatorven bakteerit (Pei ym. 2004, Bik ym. 2006). Ohutsuolessa bakteerien määrä lisääntyy ja mitä pidemmälle ruoansulatuskanavan loppupäätä edetään, sen suuremmaksi bakteerien määrä ja kirjo kasvavat (Hayashi ym. 2005, Wang ym. 2005). Paksusuolen keskimääräiseksi bakteerimääräksi on arvioitu  $4 \times 10^{14}$ , joka on ylivoimaisesti kehon runsain mikrobiympäristö, vähintään kahden suuruusluokan verran verrattuna muihin elimiin (Sender ym. 2016). Paksusuolessa mikrobit tuottavat tuhansia aineenvaihduntatuotteita eli metaboliitteja (Valdes ym. 2018). Ulsteen massasta ajatellaan olevan 50–60 % bakteerisoluja (Stephens & Cummings 1980). Bakteerien lisäksi suolistossa on normaalisti myös arkeoneja, eukaryootteja sekä viruksia (Qin ym. 2010).

Koska mikrobiston toiminta suolistossa on valtava, on sen tasapaino elintärkeää homeostaasin kannalta. Se vaikuttaa esimerkiksi metaboliaan, immunitettiin, sairauksien ehkäisyyn, patogeenisten bakteerien kolonisaatioon, ravintoaineiden imeytymiseen, pH-tasapainoon ja solusignointiin (Rinninella

ym. 2019). Suolistomikrobisto koostuu pääasiassa bakteroidien ja firmikuuttien pääjaksoista, jotka muodostavat yhdessä noin 90 % mikrobiomista (Eckburg ym. 2005, Tap ym. 2009, King ym. 2019). Muita pääjaksoja, joita suolistosta löytyy jonkin verran ovat muun muassa verrukomikrobit, aktinobakteerit, proteobakteerit sekä fusobakteerit (Eckburg ym. 2005, Tap ym. 2009).

King ym. (2019) raportoivat, että neljä yleisintä bakteeriluokkaa, verrattaessa yksittäisiä näytteitä, ovat bakteroideihin kuuluva *Bacteroidia*, firmikuutteihin kuuluva *Clostridia*, aktinobakteereihin kuuluva *Actinobacteria* sekä proteobakteereihin kuuluva *Gammaproteobacteria*. Kolme yleisintä heimoa ovat järjestyksessä *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* ja *Ruminococcaceae*. Muita yleisempiä heimoja, jotka ylittivät määrällisesti 1 %:n ovat *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Odoribacteraceae*, *Rikenellaceae* sekä *Tannerellaceae*. Kun yksittäisistä havaintoaineistoista koottiin metaboliaprofiili, saatiin yleisimmiksi bakteeriheimoksi järjestyksessä *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Akkermansiaceae*, *Rikenellaceae* ja *Ruminococcaceae*. Tässä tutkittiin suurimmaksi osaksi länsimaalaisia. He totesivat myös, että matalammassa taksonomian tasoissa, kuten lajitasolla, on enemmän maantieteellistä hajanaisuutta mikrobiomin monipuolisuuden suhteen. Ylemmissä taksonomisissa tasoissa yhdenmukaisuutta on enemmän. Esimerkiksi suurimmalla osalla länsimaalaisista yleisin bakteerisuku suolistossa on bakteroidien pääjaksoon kuuluva *Bacteroides* (Nishijima ym. 2016, King ym. 2019), mutta japanilaisilla se on aktinobakteereihin kuuluva *Bifidobacterium* (Nishijima ym. 2016). Vaikka *Bacteroides*-suvun bakteerit ovat suolistossa kommensaaleja, voivat ne olla patogeenisiä ja olla syynä esimerkiksi infektion syntyyn. Mikäli suvun bakteerit pääsevät pakenemaan suolesta, voivat ne aiheuttaa muun muassa bakteeriverisyyttä (eng. *bacteremia*) (Wexler 2007). Puolestaan *Bifidobacterium*-suvun ajatellaan edistävän terveyttä (Lee ja O'Sullivan 2010). Tap ym. (2009) raportoivat, että normaalissa suolistossa vallitsevat bakteerisuvut; *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Dorea*, *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium* ja *Bifidobacterium* (taulukko 1).

Terveen yksilön normaalia suolistomikrobiston koostumusta ei kuitenkaan ole vielä selvitetty. Suoliston mikrobeille on kuitenkin ehdotettu pysyvät ydin kolonisaatiot, jotka jokainen vallitsisivat omissa ekosysteemeissään ja pysyisivät tiettyjen bakteerien osalta muuttumattomina läpi aikuisiän. Muutokset vaikuttaisivat ennemminkin näiden bakteerein määrään kuin tiettyihin sukuihin. Kolmeksi yleisimmäksi suolistoyhteisöksi, eli enterotyypeiksi, on ehdotettu *Bacteroides*-, *Prevotella*- tai *Ruminococcus*-sukujen vallitsevat ryhmät, eivätkä ne määräytyisi kansallisuuden, ravitsemuksen tai terveydentilan mukaan. Eri enterotyyppit ovat toiminnallisesti erilaisia ja esimerkiksi niiden vitamiinin tuotantotehokkuus varioi keskenään. Ne voisivat myös selittää yksilölliset vasteet esimerkiksi ruokavalioon tai lääkkeisiin ja vaikuttaa yleisellä tasolla sairastavuuteen tai terveyteen (Arumugami ym. 2011, Huse ym. 2012, Rajilić-Stojanović ym. 2013).

Taulukko 1. Suolistossa yleisesti esiintyviä bakteereja. Taulukkoon on koottu terveen paksusuolen mikrobeja. Bakteerien osuudet vaihtelevat yksilöillä, mutta firmikuutit ja bakteroidit ovat normaalisti hallitsevia pääjaksoja suolistossa (Tap ym. 2009, King ym. 2019, Rinninella 2019).

Pääjakso	Luokka	Heimo	Suku
Firmikuutit	<i>Clostridia</i>		<i>Eubacterium</i>
		<i>Clostridiaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i>
		<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Dorea</i>
		<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>
Bakteroidit	<i>Bacteroidia</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>
		<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes</i>
		<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>
		<i>Tannerellaceae</i>	<i>Parabacteroides</i>
		<i>Odoribacteraceae</i>	
Aktinobakteerit	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Verrukomikrobit	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansiaceae</i>	<i>Akkermansia</i>
Proteobakteerit	<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>

Paksusuolella mikrobit ovat aineenvaihdunnallisesti aktiivisia. Ne fermentoivat proteiineja, ruoansulatuskanavassa syntyvää limaa sekä ravintoaineita digestasta, joka on koostumukseltaan pääasiassa sulamatonta kuitua ja hiilihydraattia (Topping ja Clifton 2001, Valdes ym. 2018). Mikrobit tuottavat aineenvaihdunnallisesti muun muassa lyhytketjuisia rasvahappoja; vitamiineja; kaasuja, kuten hiilidioksidia, vetyä ja metaania; aminohappoja sekä hajuja tuottavia molekyylejä, esimerkiksi indolia, skatolia, amiineja, ammoniakkia ja rikkivetyä (Rowland ym. 2017).

### 1.2.1 Suolistomikrobit paksusuolensyövässä

Kaikki suolen mikrobien tuottamat metaboliitit eivät ole terveydelle suotuisia molekyylejä. Tietyt mikrobit voivat edistää syövän kehittymistä muun muassa tuottamalla suolistomyrkkyjä eli enterotoksiineja, aiheuttamalla tulehdusta ja oksidatiivista stressiä (Pandey ym. 2023). Tutkimuksissa on havaittu, että suolen mikrobisto eroaa merkittävästi niin kudoksessa (Chen ym. 2012, Sanapareddy ym. 2012, da Costa ym. 2022) kuin ulosteessa (Wang ym. 2011, Zeller ym. 2014, Baxter ym. 2016, Allali ym. 2018) terveiden yksilöiden ja PSS:ää sairastavien välillä. Eron voi havaita mikrobiston koostumuksessa jo terveen kudoksen ja kasvaimen mikroympäristön välillä PSS:n potilailla (Burns ym. 2015, Gao ym. 2015, Cremonesi ym. 2018, Choi ym. 2021). Suurimmassa osassa näistä tutkimuksissa kolme suurinta pääjaksoa ovat järjestyksessä firmikuutit, bakteroidit ja proteobakteerit, mutta niiden määrät varioivat tutkimusten välillä.

Esimerkiksi firmikuuotteja ei aina yhdistetä PSS:ään, sillä osassa tutkimuksia niiden määrä on verrattain vähäisempi syöpäkudoksessa kuin terveessä kudoksessa (Gao ym. 2017, Cremonesi ym. 2018, Choi ym. 2021). Fusobakteerien pääjakso lisääntyy merkitsevästi PSS:ää sairastavien ulosteessa ja syövän mikroympäristössä (Zeller ym. 2014, Burns ym. 2015, Cremonesi ym. 2018). Sukutasolla PSS:n potilailla on havaittu *Bacteroides*-, *Roseburia*-, *Ruminococcus*- ja *Oscillibacter*-sukujen lisääntynyt määrä sekä bakteerisukuja, jotka ovat suun patogeenejä, kuten *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* sekä *Porphyromonas* (Flemer ym. 2017).

Todennäköistä on, että PSS:n mikroympäristölle tyypillinen mikrobisto on muodostunut jo ennen kasvaimen alkua, ja siten vaikuttaa syövän synnyn alkuvaiheissa ja etenemisessä (Kohoutova ym. 2014, Flemer ym. 2017). Vaikka terveiden mikrobikoostumus suolessa voi varioida populaatioiden välillä, on mahdollista, että PSS:ään liittyvän dysbioosin mikrobiominen tausta olisi maailmanlaajuinen (Yu ym. 2017). Ulosteen bakteeriprofiilin on myös havaittu eroavan PSS:n kehityksen erivaiheissa, jolloin tietyt bakteerisuvut ja -lajit voisivat toimia indikaattoreina mikrobiomin muutoksesta kasvaimen muodostumisessa eli neoplasiassa (Zeller ym. 2014, Wu ym. 2021).

Suolistomikrobiston tiedetään varioivan PSS:n primaarikasvaimen sijainnin perusteella (Dejea ym. 2014, Kohoutova ym. 2014, Gao ym. 2015, Flemer ym. 2017). Vasemmanpuoleisissa kasvaimissa on havaittu enemmän *Escherichia-Shigella*-, *Fusobacterium*- ja *Leptotrichia*-suvun bakteereita (Gao ym. 2015). Oikeanpuoleisista kasvaimista on löytynyt muun muassa suhteessa enemmän *Pyramido-bacterium*-, *Prevotella*-, *Peptostreptococcus*- ja *Selenomonas*-sukuja verrattuna vasemmanpuoleisiin. Dejean ym. (2014) havaitsivat tutkimuksessaan runsaan järjestäytyneen bakteerikerrostuman, niin kutsutun biofilmin, olevan vahvasti yhteydessä oikeanpuoleisiin kasvaimiin. He totesivat, että biofilmi lisää interleukiini-6:n (IL-6) eritystä suolen epiteelisoluista, myös niillä terveillä kontrolleilla, joilla biofilmiä löytyi suolistosta ilman kasvaimia. Tämän perusteella biofilmin kehittyminen voisi laukaista karsinogeenisen tulehduksen kudoksessa. Biofilmi muodostuu suolen sisemmässä limakerroksessa, joka on normaalisti vapaa mikrobeista. Tämän takia bakteerit ovat siten suorassa kosketuksessa epiteelisoluihin (Kenis ym. 2013). Eroa mikrobiston koostumuksessa PSS:n puoleisuuseroissa on kartoitettu kuitenkin vasta vähän.

### 1.3 Tulehdus ja paksusuolensyöpä

Tulehduksellinen mikroympäristö on tyypillinen syövän ominaisuus ja kasvaimen leviämistä tukeva reaktio, myös niissä syöpätapauksissa, jotka eivät ole seurausta tulehduksesta (Borello ym. 2005, Mantovani ym. 2008). Tulehdus itsessään on immuunipuolustuksen fysiologinen vaste vauriosta ja tulehduksellisia tekijöitä vastaan. Se on seurausta esimerkiksi haavan paranemisesta, äkillinen tulehdus häviää itsestään tulehdusta estävien aineiden, eli anti-inflammatoristen molekyylien avulla (Hanahan ja Weinberg 2011, Pecorino 2012).

Yhteys syövän ja tulehduksen välillä muodostuu kahdesta reitistä. Toisessa tulehduksellinen tila kasvattaa syöpäriskiä ja tämä mielletään ulkopuolelta tulevaksi tulehdukseksi (eng. *extrinsic inflammation*). Tähän lukeutuvat syyt, jotka laukaisevat kroonisen tulehduksen, kuten infektiot ja autoimmuunisairaus. PSS onkin yksi niistä syöpätyypeistä, joihin tämä tulehduksellinen reitti vaikuttaa merkittävästi (Mantovani ym. 2008), sillä paksusuolen krooninen pitkäaikainen tulehdus johtaa syövän kasvavaan riskiin eli se edistää karsinogeenisyyttä. Pitkäaikainen tulehduksellinen suolistosairaus lisääkin PSS:n riskiä 2,4-kertaisesti muuhun väestöön verrattuna (Bernstein ym. 2001, Jess ym. 2012, Jussila ym. 2013).

Toinen tulehdukseen johtava reitti aktivoituu geneettisten tapahtumien takia, muuttaen solujen normaalia toimintaa. Nämä solut tuottavat muun muassa tulehdusvälittäjäaineita, luoden syöväälle ominaisen tulehduksellisen mikroympäristön. Tätä ajatellaan sisäsyntyisenä tulehduksena (eng. *intrinsic inflammation*) ja se on syövästä johtuva tulehdus (eng. *cancer-related inflammation*) (Mantovani ym. 2008).

Yksi merkittävä tulehdusvälittäjäaine on proinflammatorinen sytokiini IL-6, jonka tuotanto lisääntyy tulehdusreaktiossa muun muassa infektioissa ja immuunivasteen aikana (Silvennoinen ja Hurme 2003). Sillä on patogeeninen rooli PSS:ssä, edesauttaen epiteelisolujen proliferaatiota (Brennan ja Garrett 2016). IL-6 esimerkiksi myötävaikuttaa verisuonten kehittymistä, eli angiogeneesiä kasvainkudoksessa (Nagasaki ym. 2014) ja myös metastasointia (Achizawa ym. 2006). Sen pieni määrä seerumissa ennustaa leikattujen PSS:n potilaiden pidempää tautivapaata eloonjäämisjakoa (eng. *disease-free survival*) (Xu ym. 2016), vastaavasti korkea pitoisuus yhdistetään potilaiden huonoon ennusteeseen (Feng ym. 2023).

IL-6:n lisäksi kasvaimen mikroympäristössä yleinen on myös sytokiini kemokiini (C-C-motiivi) ligandi 2 (eng. *CC chemokine ligand 2*, CCL2), toiselta nimeltään monosyytti kemoattraktiivinen proteiini-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1). Sen määrän on havaittu lisääntyvän PSS:n kudoksessa (Baier ym. 2005) ja edistävän kasvaimen muodostumista suolistossa (McClellan ym. 2012). CCL2/MCP-1:n tiedetään olevan merkittävä makrofageja houkutteleva kemokiini syövän mikroympäristössä, mikä tukee kasvaimen kasvua (Bailey ym. 2007). Näillä kahdella sytokiinillä, IL-6 ja CCL2/MCP-1, on toisiaan avustava vaikutus ja niiden epänormaali säätely edistää syövän selviytymistä. Näiden sytokiinien on huomattu parantavan M2-tyypin makrofagien toimintaa (Roca ym. 2009). Ne myös ehkäisevät solukuolemaa eli apoptoosia (Liu ym. 2007). Vaikka tulehduksellisia tekijöitä on yhdistetty PSS:ään, ei IL-6:n ja CCL2/MCP-1:n merkitystä kasvaimen puoleisuseroissa ole tutkittu.

### 1.3.1 Tulehdus ja suolistomikrobisto

Biofilmin muodostuksessa merkittäviä ovat bakteerien siimat eli flagellat, jotka ovat tiettyjen bakteerien liikkumiselimiä (Belas 2013). Siimallisten bakteeripopulaatioiden määrän on todettu kasvavan hiirillä, joiden ihon alle istutettiin PSS:n soluja (Pekkala ym. 2019). Lisäksi flagellan pääasiallisen rakenneproteiinin eli flagelliinin on osoitettu aiheuttavan tulehdusta (Sanders ym. 2006) ja se on yhdistetty suurempaan PSS riskiin miehillä (Kong 2016).

Tollin kaltaiset reseptorit (eng. *Toll-like receptor*, TLR) tunnistavat sekä kommensaalisten että patogeenisten bakteerien tuottamia molekyylejä (Takeda ym. 2003) ja flagelliinille tämä on TLR5 (Hayashi ym. 2001). TLR5 ilmentyy vasta kun flagelliiniproteiini pääsee suolen epiteelin läpi. Tämä aiheuttaa proteiinia esittelevien solujen transkriptiota säätelevän, transkriptiotekijöiden proteiinikompleksin eli NF- $\kappa$ B-signaalireitin aktivoitumisen ja proinflammatoristen sytokiinien, kuten IL-6:n, tuotannon lisääntymisen (Gewirtz ym. 2001, Eaves-Pyles ym. 2001). Rheen ym. (2005) tutkimuksessa vaurioitunut paksusuoli altistettiin flagelliinille, se tehosti tulehdusta ja epiteelisolujen apoptoosia. Reaktiolla on merkitys koliitin kehittymisessä ja etenemisessä. Tulehduksellinen mikroympäristö aiheuttaa epiteelin vaurioitumisen suolistossa, jolloin flagelliinin lisäksi muut mikrobien erittämät tulehdukselliset molekyylit pääsevät verenkiertoon. Flagelliinin onkin havaittu lisäävän IL-6:n ja CCL2/MCP-1:n ilmentymistä viljellyissä PSS:n soluissa (Pekkala ym. 2019).

Flagelliinia on tutkittu eri syöpätyypeissä, sen ilmentymisen vaikutus kasvaimen edetessä on kuitenkin ristiriitainen. Varmuutta ei ole siitä edistääkö (Bohnhorst ym. 2006, Sfondrini ym. 2006) vai hillitseekö (Rhee ym. 2008, Cai ym. 2011) sen ilmentyminen kasvaimen etenemistä. Sen takia on tärkeä tuoda lisää tietoa flagelliinin vaikutuksesta syövässä.

## 1.4 Tutkielman tavoitteet

Tässä tutkielmassa selvitetään edelleen flagelloitujen bakteerien, flagelliiniproteiinin ja tulehduksen merkitystä sekä yhteyttä PSS:ssä. Tavoitteena on tutkia oikean- ja vasemmanpuoleisten kasvaimen eroja mikrobikoostumuksessa ja tulehdustekijöissä. Hypoteeseina ovat, että mikrobikoostumus eroaa potilaiden välillä; potilailla, joilla on oikeanpuoleinen kasvain, on suurentunut määrä flagelloituja bakteerisukuja sekä lisääntynyt IL-6, CCL2/MCP-1 ja flagelliini/TLR5 -tulehdustekijöiden ilmentyminen. Potilaiden kasvainkudoksesta ja ulostenäytteistä analysoidaan mikrobikoostumus, tunnistamalla bakteerien 16S ribosomaalisen RNA (rRNA) -geenin nukleotidien tarkka järjestys, eli geeni sekvensoidaan. Geeni koodaa proteiinia 16S rRNA:ta, joka on ribosomin pienemmän alayksikön, S30, rakennusosa. Geenissä on yhdeksän konservoitunutta aluetta, joilla on laajin tietokanta verrattuna muihin geenikohteisiin. Tulehdustekijät määritetään kääntämällä kasvaimista eristetty lähetti-RNA (mRNA) komplementaariseksi

DNA:ksi (cDNA), jotta kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (qPCR) voidaan suorittaa geenien ilmentymistasojen analysoimiseksi.

## **2 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **2.1 Aineisto**

Tutkielmassa käytetty aineisto kerättiin keväällä 2021 Keski-Suomen Keskussairaalan rekrytoitavilta potilailta, jotka olivat kirurgian yksikössä leikattavia PSS-potilaita. Tutkittavien rekrytointi kysyttiin ensimmäisen poliklinikkakäynnin aikana, jolloin suostumus tutkimukseen pyydettiin. Potilaita rekrytoitiin kaiken kaikkiaan kahdeksan ja he jakautuivat kahteen ryhmään 1) potilaat, joilla on oikeanpuoleinen kasvain (3 henkilö) ja 2) potilaat, joilla on vasemmanpuoleinen kasvain (5 henkilöä).

Tutkittavien ikää ei rajoitettu, mutta vajaavaltaisia potilaita tai alaikäisiä ei rekrytoitu. Poissulkukriteerejä olivat myös muistisairaudet ja tulehdukselliset suolistosairaudet, sekä antibioottikuuri enintään kuukausi ennen leikkausta ja näytteenottoja. Juuri ennen leikkausta potilaille annettiin antibioottihoito.

Ennen leikkausta potilailta pyydettiin ulostenäytteet, itse kerättäväksi ja toimitettavaksi pakastettuina sairaalalle normaalikäynnin yhteydessä. Leikkauksessa poistetut suolenosat suljettiin ompeleilla kuljetusta varten. Leikatusta suolenosan kasvaimesta pakastettiin pala tutkimusta varten patologian laboratoriossa. Näytteet käsiteltiin Jyväskylän yliopiston liikuntatieteellisen tiedekunnan Liikunta- ja terveyslaboratoriossa.

### **2.2 Menetelmät**

Mikrobianalyysia varten uloste- ja kasvainnäytteistä eristettiin DNA, joka määritettiin monistamalla (PCR I) ja tunnistamalla (PCR II) sekä sekvensoimalla 16S-rRNA:n vaihtelevat alueet V3-V4 (taulukko 2 ja 3). Tulehdukseen liittyvien mRNA:iden ilmentymistasojen määrittämistä varten kasvainnäytteistä eristettiin mRNA, joka käänteiskopioijaensyymillä avulla muutettiin cDNA:ksi. Ennen qPCR-geeniekspressioajoja suoritettiin alukkeiden validointi (taulukko 2 ja 4), jotta optimaalinen lämpötila ja cDNA:n laimennus tiedettiin.



Taulukko 2. Polymeraasireaktioiden reagenssit mikrobi- ja tulehdusanalyyseissä.  
Primer = aluke; forward primer = etualuke; reverse primer = taka-aluke.

	Valmistaja	per reaktio (µl)
<b>PCR I Master Mix</b>		
<i>mikrobianalyysi</i>		
SYBR Maxima (2x)	Bio-Rad (lot. 0101718)	10
Forward Primer S-17 (10 µM)	Metabion International	0,5
Reverse Primer A21 (10 µM)	Metabion International	0,5
Nukleaasivapaa vesi	Thermo Scientific	7
DNA templaatti		2
<b>PCR II Master Mix</b>		
<i>mikrobianalyysi</i>		
iQ SYBR	Bio-Rad	10
P1 primer (10 µM)	Metabion International	1
M13 primer (1 µM)	Metabion International	1
Nukleaasivapaa vesi	Thermo Scientific	6
PCR I templaatti		1
Yksilötunniste		1
<b>Alukkeiden validointi</b>		
<i>tulehdusanalyysi</i>		
SYBRGreen (2x)		10
Forward Primer		1
Reverse Primer		1
Steriilivesi		3
cDNA templaatti		5

Taulukko 3. Mikrobianalyysissä käytetyt alukkeet PCR I ja PCR II -reaktioissa.  
W = tyymiin tai adeniinin heikko vuorovaikutus.

Aluke	Sekvenssi (5' → 3')
S-D-Bact-0341-b-S-17	CCTACGGGNGGCWGCAG
S-D-Bact-0785 a-A-21	GACTACHVGGGTATCTAATCC
P1-S-D-Bact-0785-a	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGACTACHVGGGTATCTAATCC
M13-S-D-Bact-0341-b	TCTAAAACGACGGCCAGTCCTACGGGNGGCWGCAG

Taulukko 4. Tulehdusanalyysissä käytettyjen etu- ja taka-alukkeiden sekvenssit.  
Forward = etualuke; reverse = taka-aluke.

Aluke		Sekvenssi (5'→3')
IL-6	forward	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG
	reverse	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
CCL2/ MCP-1	forward	CAGCCAGATGCAATCAATGCC
	reverse	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
TLR5	forward	TCCCTGAACTCACGAGTCTTT
	reverse	GGTTGTCAAGTCCGTAATAATGC

### 2.2.1 Mikrobianalyysi

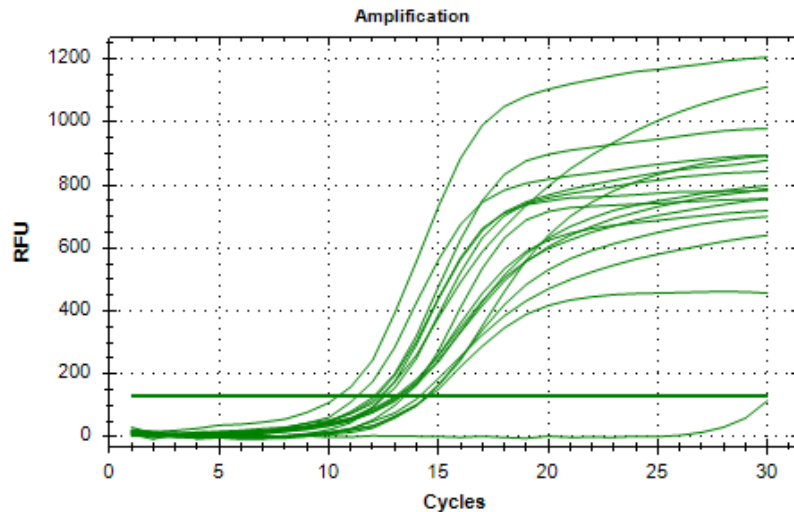
Ulostenäytteet sulatettiin huoneenlämmössä ja DNA eristettiin siihen tarkoitettulla valmiilla työkalupakkauksella (eng. *kit*) (Fecal DNA kit w/Beads, Omni International, Kennesaw, GA, USA) sekä homogenisoimalla alussa näytteet helmillä. Ohjaaja Satu Pekkala eristi DNA:n kasvainnäytteistä ja eristyksissä seurattiin valmistajan ohjeita. Ulosteesta ja kasvaimesta saatujen DNA-näytteiden konsentraatiot mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä (ND-1000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Mittauksen jälkeen ulostenäytteistä kaksi puhdistettiin (OneStep PCR Inhibitor Removal kit D6030, Zymo Research, Irvine, CA, USA) heikon puhtausasteen takia ja niiden DNA-konsentraatio mitattiin uudelleen. DNA:n konsentraatio vaihteli ulostenäytteissä välillä 17,3–55,4 ng/μl ja kasvainnäytteissä välillä 134,1–322,4 ng/μl. Näytteet pakastettiin (-80 °C) konsentraatiomittausten jälkeen.

Osa näytteistä laimennettiin nukleasivapaalla vedellä polymeerasiketjureaktioon. Ulosteen DNA-näytteet, joiden konsentraatio oli  $\geq 39$  ng/μl laimennettiin, jotta kaikkien näytteiden lopullinen konsentraatio oli välillä 17,3–22,8 ng/μl. Kasvainnäytteissä suuren ihmisestä peräisin olevan DNA:n takia, kaikki näytteet laimennettiin siten, että lopullinen DNA-konsentraatio oli välillä 28,02–38,93 ng/μl. Reaktioseos (taulukko 2) valmistettiin 96-kuoppalevyille ja ensimmäinen PCR-ohjelma (taulukko 5) ajettiin Real-time quantitative PCR -laitteella (CFX96™, C1000 Touch Thermal Cycler, BioRad laboratories, Hercules, CA, USA).

Taulukko 5. PCR-ajojen ohjelmat.

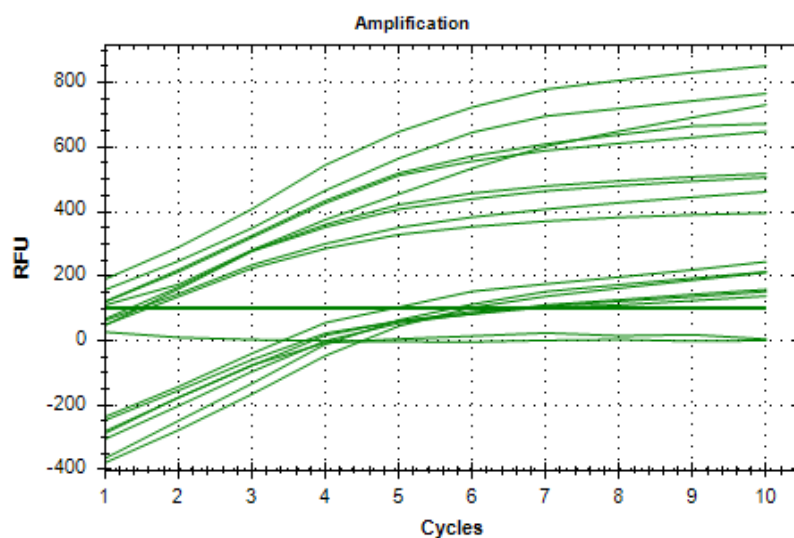
Kierros	Lämpötila (°C)	PCR I (min)	PCR II (min)
1. alkudenaturaatio	95	10	10
2. denaturaatio	94	0:30	0:30
3. alukkeen kiinnitys	52	1	1
4. pidennys	72	1	1
5. monistussykli		+plate read go to 2, 29 more times	+plate read go to 2, 9 more times
6. loppupidennys	72	5	5
End			

kGeenialueen monistusreaktion jälkeen (kuva 2) PCR I:n tuotteisiin lisättiin sekvensointiadapteri ja yksilötunnisteet (eng. *barcodes*) toisessa PCR-reaktiossa (taulukko 2 ja 5). Yksilötunnisteet mahdollistavat eri alkuperää olevien näytteiden tunnistamisen sekvenssikirjastosta eli poolista.



Kuva 2. Mikrobianalyysin PCR I:n monistuskäyrät. Ensimmäisessä ajossa monistettiin kasvain- ja ulostenäytteistä eristetty DNA.

PCR II-tuotteet (kuva 3) puhdistettiin magneettisilla helmillä (AMPure XP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), jotka sitovat halutun DNA:n, kun lopulliset PCR-tuotteet puhdistetaan näytteistä pois. Puhdistus tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan suoraan 96-kuoppalevyille. Puhdistusreagenssia käytettiin näytettä kohden 36  $\mu$ l, joka oli 1,8x näytetilavuutta (20  $\mu$ l) kohden. Lopuksi näytteet eluoiitiin 40  $\mu$ l:aan steriiliin veteen (Molecular Biology Reagent, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ja siirrettiin puhtaalle 96-kuoppalevyille.



Kuva 3. Mikrobianalyysin PCR II:n monistuskäyrät. Toisessa PCR-ajossa tunnistettiin kasvain- ja ulostenäytteistä eristetty DNA.

Seuraavaksi näytteet valmisteltiin DNA:n konsentraatiomääritykseen GloMax-laitteella (GloMax Multi detection System, Promega, USA), käsittelemällä ne PicoGreen-kitillä (Quant-iT, PicoGreen dsDNA Assay kit, lot. 2194839, Invitrogen, Waltham, MA, USA). Käyttöliuokseen PicoGreen-reagenssi laimennettiin 1:200 ja Lambda DNA -standardit 1:50 1xTE puskurilla. 96-kuoppalevyille pipetoitiin PicoGreen-käyttöliuosta 100 µl ja näyte-DNA:ta 5 µl per kaivo sekä standardit. Konsentraatio mitattiin valmiilla fluoresenssi protokollalla.

Jotta tiedettiin paljonko näytteitä tulisi pipetoida sekvensointipooliin niin, että DNA:n määrä oli 0,5 ng per näyte, yksittäisten näytteiden DNA-konsentraatio selvitettiin käyttämällä standardisuoraa ja fluoresenssimittauksen absorbanssituloksia. DNA:n konsentraatio varioidi näytteiden välillä 45,40–80,52 ng/ml, joten pipetointitilavuus poolia varten oli näytteen mukaan 6,2 µl:sta 11,0 µl:aan.

Työvaiheista PCR-ajot ja konsentraation määrittäminen tehtiin yhdessä tohtorikoulutettava Elina Mäkisen kanssa ja sekvensointiajon suoritti erikoislaboratoriomestari Elina Virtanen Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella.

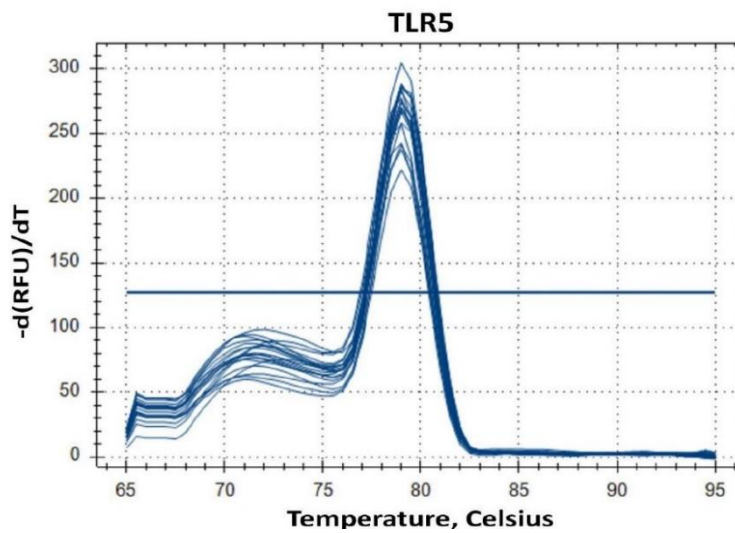
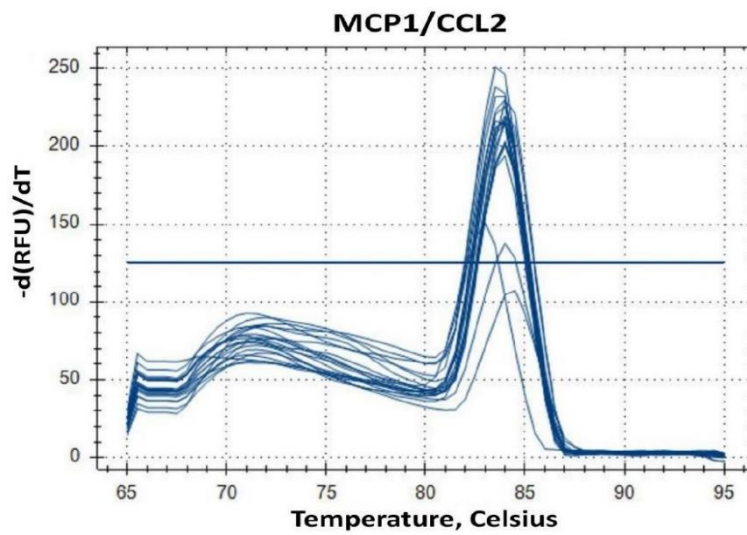
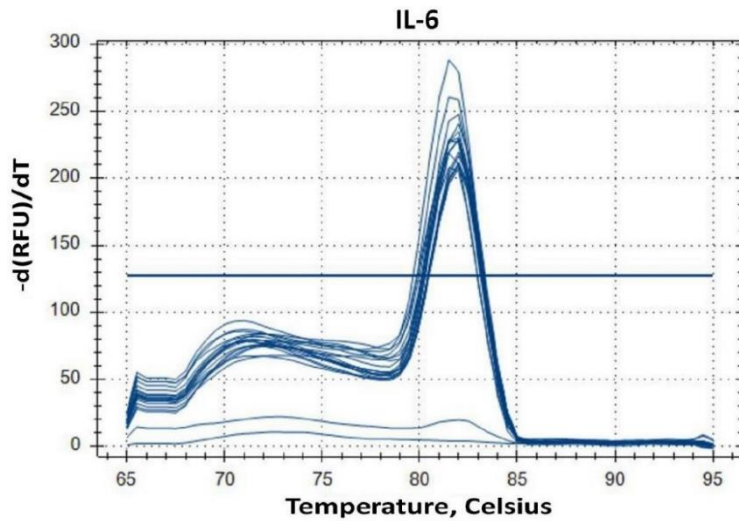
## 2.2.2 Tulehdusanalyysit

Tulehduksen ilmentymisen määrittämistä varten totaali-RNA eristettiin kasvainnäytteistä, jotka leikattiin jäädyneistä kasvainpaloista. Eristys tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti homogenoimalla näytteet TissueLyser-laitteella (TissueLyserII, Qiagen, Hilden, Saksa) TRI-reagenssissa (RNA/DNA/protein isolation, Zymo Research lot.192917). Osa RNA-näytteistä laimennettiin kolminkertaisesti, jotta lopullinen konsentraatio näytteiden välillä oli 593,9–1145,2 ng/µl, mikä mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä.

Kasvainkudoksesta eristetty mRNA käännettiin cDNA:ksi Advanced cDNA Synthesis -kitillä (iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, Bio-Rad), seuraten valmistajan ohjeita ja reaktioluokseen käytettiin 3 µg RNA:ta. Synteesireaktion jälkeen näytteet pakastettiin (-20 °C).

Ennen qPCR-ajoa, alukkeet validoitiin (kuva 4) käyttäen cDNA-poolilaimennoksia 1 ng, 2,5 ng, 5 ng sekä 25 ng, pooli valmistettiin 5 µl:sta jokaista cDNA-näytettä kohden. IL-6, CCL2/MCP-1 sekä TLR5 etu- ja taka-alukkeiden kantaliuokset valmistettiin 100 µM:iin, joista laimennettiin 1:10 käyttöliuokset reaktioseokseen (taulukko 2 ja 4). Negatiivisina kontroleina käytettiin reaktioseosta ilman cDNA-templaattia.

Alukkeiden validointiajon perusteella geeniekspression qPCR-ajoon, jokaista cDNA-näytettä käytettiin 25 ng laimennoksena sekä alukkeille IL-6 ja TLR5 käytettiin kiinnittymislämpötilaa (eng. *annealing*) 61 °C ja CCL2/MCP-1 60 °C. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaisnäytteet. Standardeina käytettiin aikaisemmin tehtyä poolin laimennossarjaa ja negatiivisena kontrollina reaktioluosta ilman cDNA-templaattia. cDNA-konsentraatio määritettiin näytteistä GloMax-laitteella (Promega, Madison, WI, USA), käsittelemällä ne ensin PicoGreen-kitillä.



Kuva 4. Tulehdusanalysissä käytettyjen alukkeiden validointikuvaajat. Alukkeiden optimaalisen lämpötilän määrittäminen cDNA qPCR-ajoa varten.  $-d(\text{RFU})/dT$  on relatiivisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.

### 2.2.3 Aineiston tilastollisen käsittely

Geeniekspressioiden tilastolliset analyysit tehtiin IBM SPSS Statistics 28.0 Windows-version-ohjelmistolla. Ensin tutkittiin muuttujien normaalijakautumista Shapiro-Wilksin-testillä. Ryhmävertailuun käytettiin riippumattomien otosten parametrilla t-testiä. Normaalijakautuneiden muuttujien välisiä yhteyksiä arvioitiin Pearsonin korrelaation avulla. Tilastollisten analyysien merkittävyyden raja-arvo oli  $p < 0,05$ .

Suolistomikrobiston tilastolliset analyysit tehtiin CLC Microbial Genomics -ohjelmistopakettilla (Qiagen). Suolistomikrobiston ryhmävertailussa sekä alfadiversiteettimittaukset (Chao 1 ja Shannon) että fylogeneettinen diversiteetti analysoitiin Kruska-Wallisin testillä. Suolistomikrobiston ryhmien väliset beetadiversiteetti-analyysit pohjautuivat Bray-Curtis dissimilarityindeksiin ja PERMANOVA (eng. *permutational multivariate analysis of variance*) -analyysiin. Taksonominen eroavaisuus ryhmien välillä analysoitiin käyttäen varianssianalyysi (eng. *analysis of variance*, ANOVA) -pohjaista vertailua, minkä jälkeen väärin positiivisten havaintojen kontrolloimiseksi käytettiin Benjamini-Hochbergin monivertailukorjausta (eng. *correction for multiple testing*). Taksonomisessa vertailussa merkitsevyyden raja-arvo oli FDR (eng. *false discovery rate*)  $p < 0,05$ . Tilastollinen analyysi tehtiin yhdessä ohjaaja Satu Pekkalan kanssa.

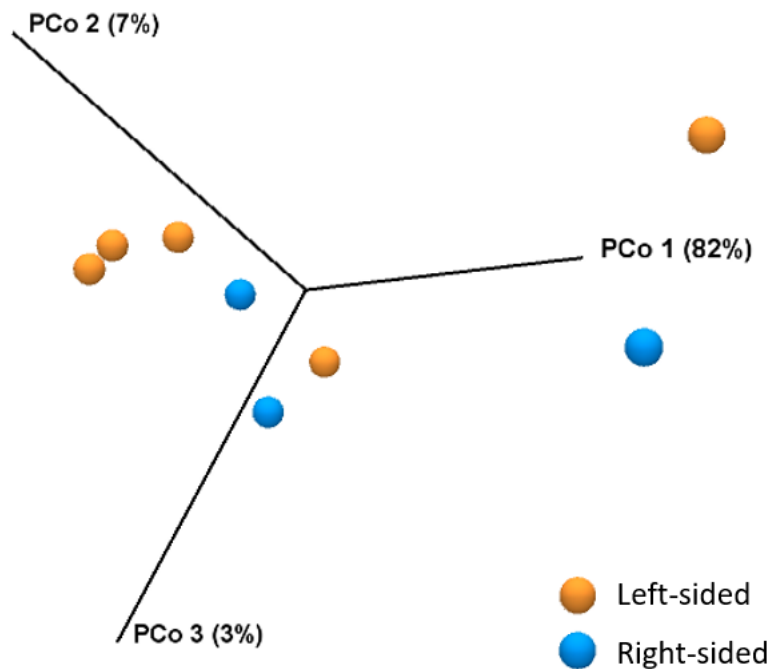
## 3 TULOKSET

### 3.1 Suolistomikrobiston analyysit

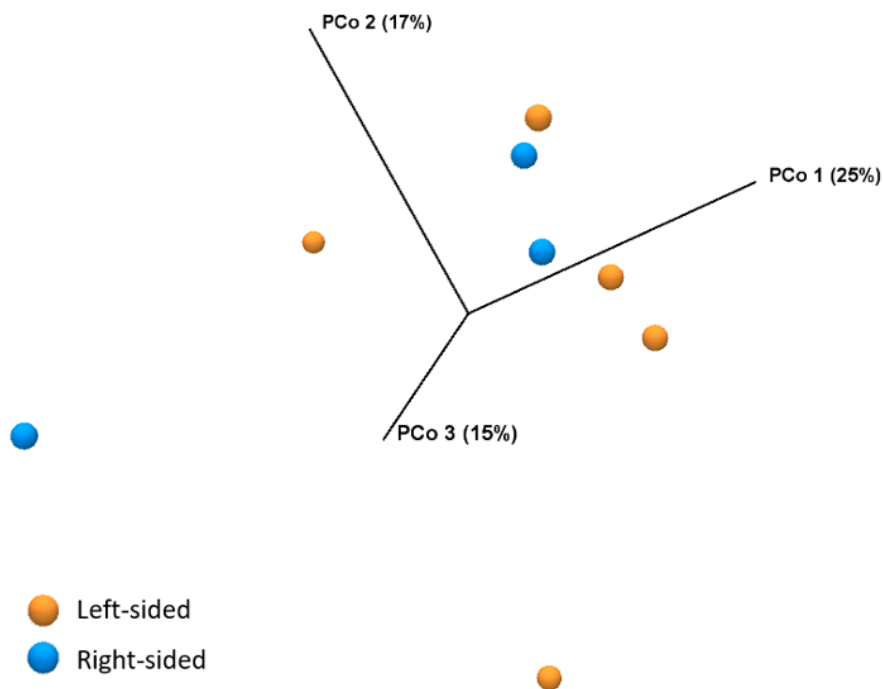
Vasemman- ja oikeanpuoleisten kasvainten välistä mikrobikoostumuksen eroavaisuutta kasvainnäytteistä (kuva 5) ja ulostenäytteistä (kuva 6) analysoitiin beetadiversiteetin kautta, jonka määrittämiseen käytettiin Bray-Curtis dissimilarityindeksiä. Pääkoordinaattianalyysissä pisteet kuvaavat suolistomikrobiston koostumuksen eroavaisuutta, yksittäisten näytteiden välillä. Pisteiden välinen etäisyys kertoo näytteiden samankaltaisuudesta, lähempänä olevat pisteet ovat enemmän samankaltaisia keskenään.

Mikrobiston alfadiversiteettiä käytettiin analysoitaessa kasvainten puoleisuuserojen välistä mikrobiston lajirunsautta. Chao1-indeksiä käytettiin määrittäessä lajien runsautta ja Shannon entropia -indeksiä määrittäessä lajien diversiteettiä niin kasvainkudoksesta (kuva 7) kuin ulosteesta (kuva 8), joihin käytettiin OTU:un perustuvaa analyysiä. Shannon entropia -indeksi kertoo lajidiversiteetin määrästä, jolloin korkeampi indeksin arvo kertoo suuremmasta diversiteetistä. Kasvainnäytteistä (kuva 9) ja ulostenäytteistä (kuva 10) määritettiin fylogeneettinen diversiteetti, jolla mitataan fylogeneettisten haarojen summaa taksonien kesken näytteissä. Analyysien perusteella ulosteen ja kasvainten mikrobiston diversiteetissä ei näy puoleisuuseroja.

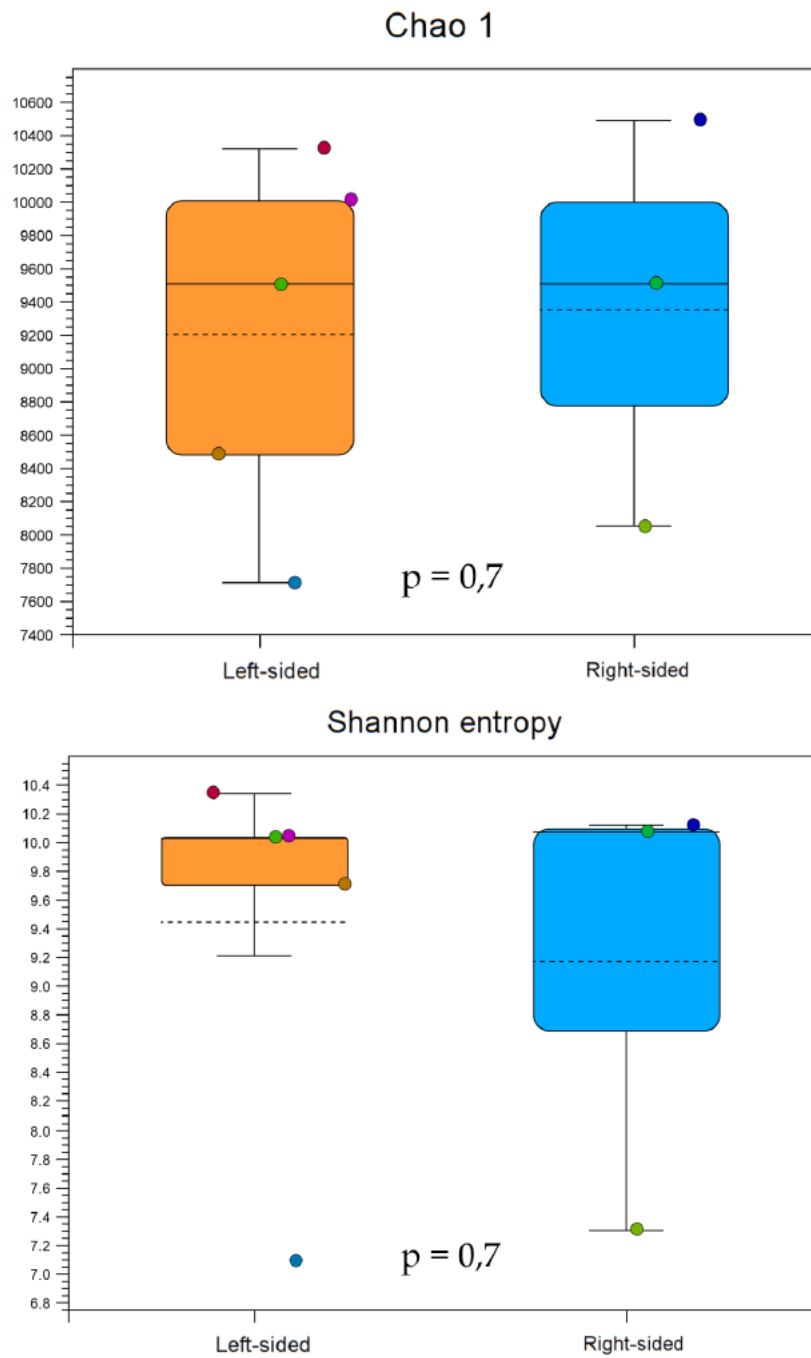
Taksonomisten vertailujen (ANOVA) perusteella ulostenäytteiden mikrobistossa ei ollut merkittäviä puoleisuuseroja, mutta kasvainnäytteistä eroavaisuuksia löytyi viiden bakteerisuvun ja yhden lahkun väliltä.



Kuva 5. Kasvainnäytteiden pääkoordinaattianalyysi mikrobiston beetadiversiteetistä (Bray-Curtis).

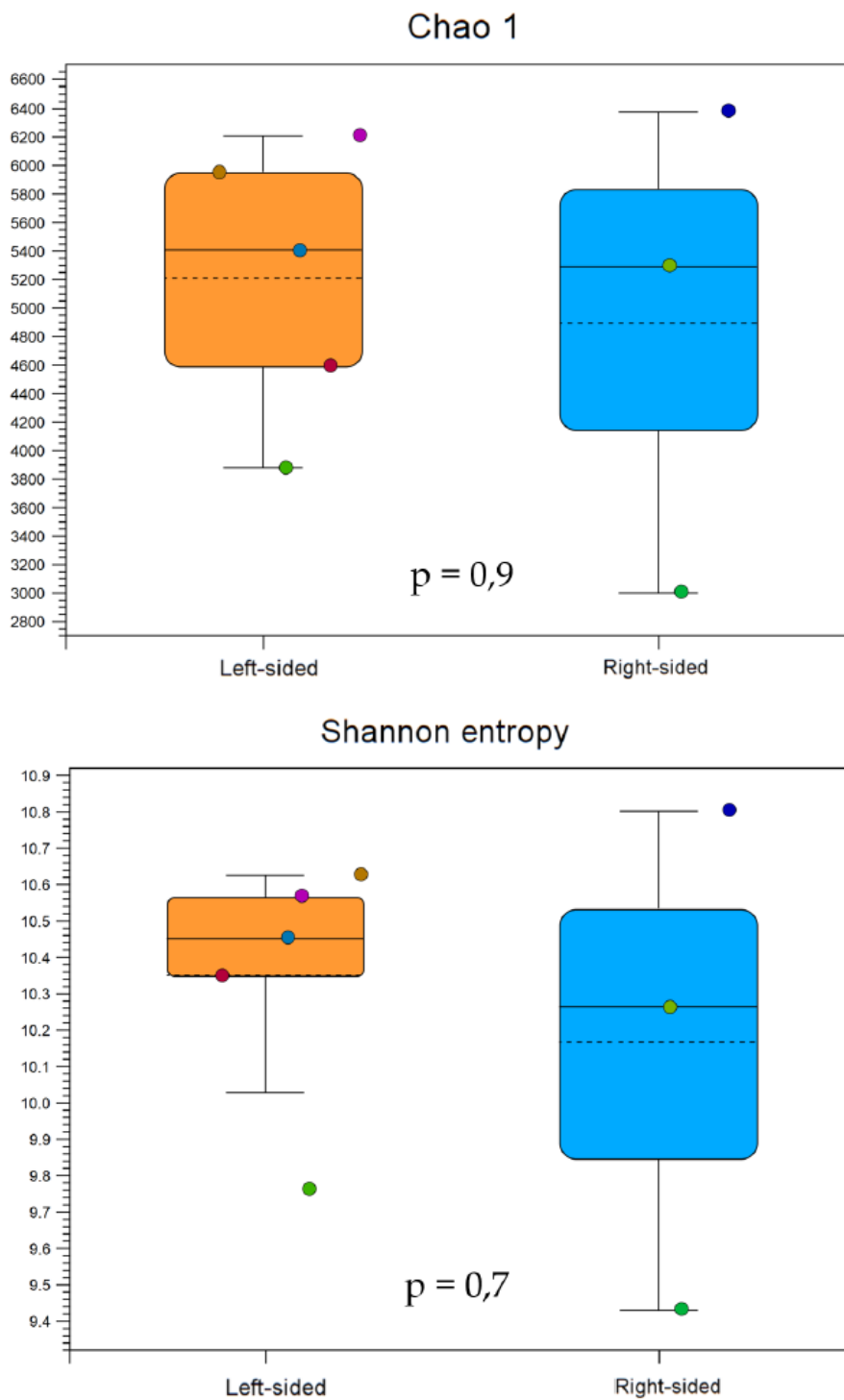


Kuva 6. Ulostenäytteiden mikrobiston pääkoordinaattianalyysi beetadiversiteetistä (Bray-Curtis).

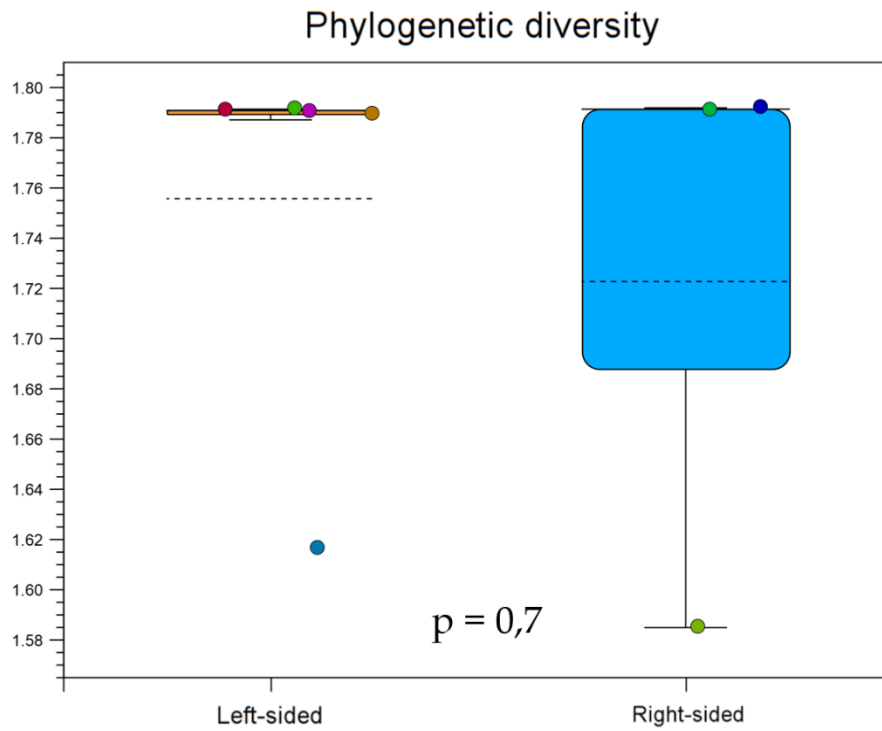


Kuva 7. Suolistomikrobiston alfa-diversiteetti kasvainnäytteissä. Chao1 kertoo lajien runsaudesta ja Shannon entropia lajien monimuotoisuudesta. Merkittävää eroavaisuutta ei ole vasemman- ja oikeanpuoleisten näytteiden välillä.

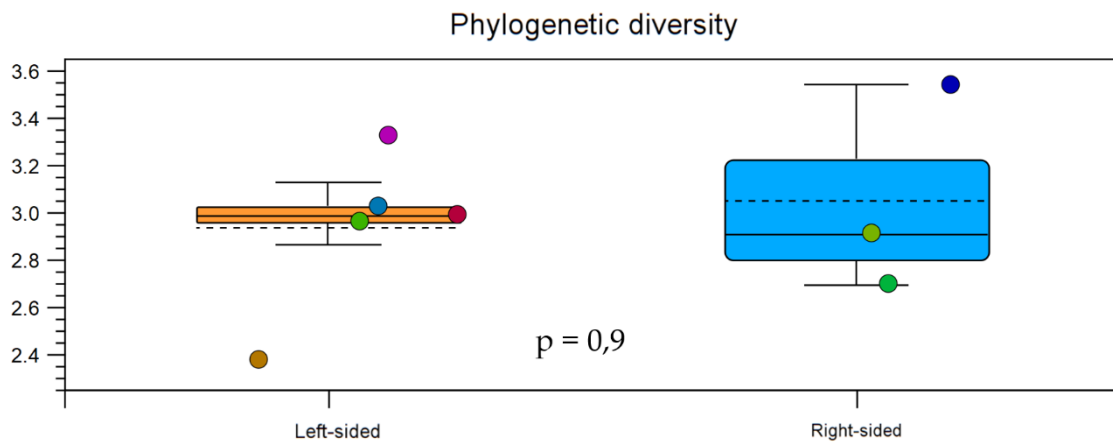




Kuva 8. Ulostenäytteiden mikrobiston alfadiversiteetti. Chao1 näyttää mikrobilajien runsauden, kun Shannon entropia kertoo lajien monimuotoisuuden. Analyysin pohjalta, ei merkittävää puoleisuuseroa kasvaimen sijainnin perusteella.



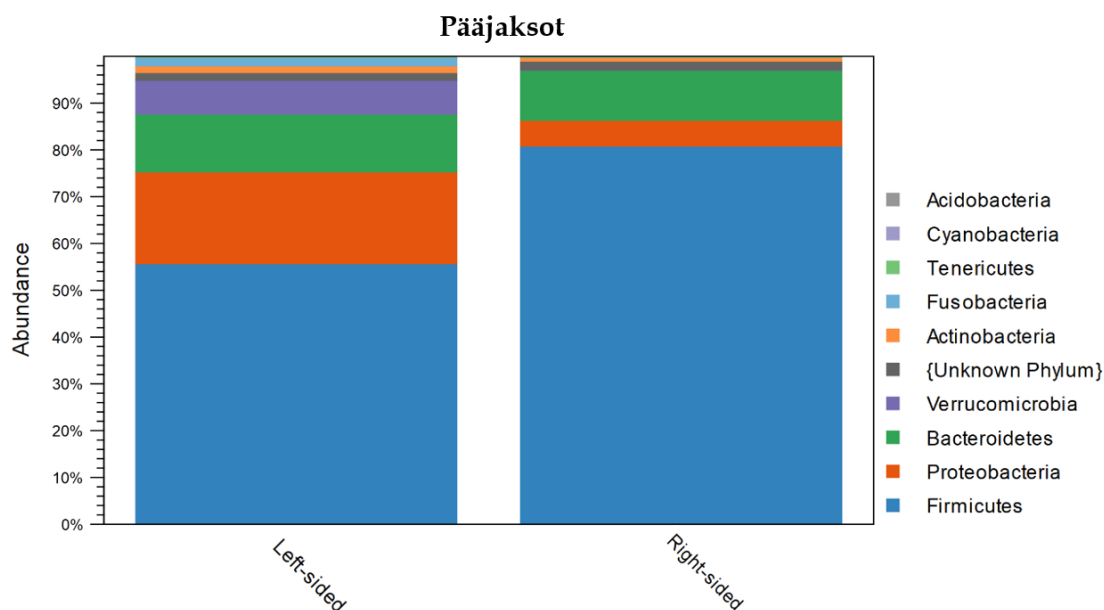
Kuva 9. Alfadiversiteetin fylogeneettinen diversiteetti kasvainnäytteiden mikrobistosta. Ei merkittävää puoleisuuseroa kasvainten sijainnin perusteella.



Kuva 10. Ulostenäytteiden mikrobiston alfadiversiteetin fylogeneettinen diversiteetti. Ei merkittävää eroa kasvaimen puoleisuudessa.

### 3.1.1 Kasvainnäytteiden mikrobikoostumus

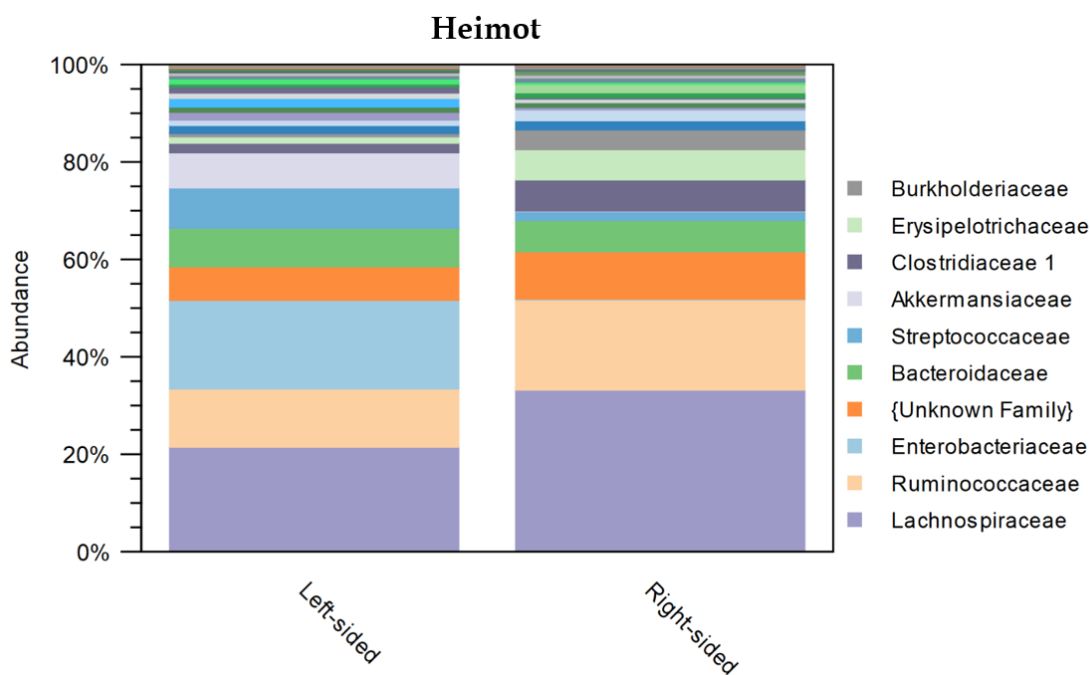
Kasvainnäytteitä hallitsivat firmikuuttien, proteobakteerien ja bakteroidien pääjaksot (kuva 11). Molemmen puoleisissa näytteissä firmikuutit olivat hallitsevin pääjakso, mutta oikeanpuoleisissa kasvaimissa niiden määrä oli suurempi. Proteobakteerien määrä taas oli vasemmanpuoleisiin verrattuna matalampi, bakteroidien määrä molemmissa oli lähes sama. Vasemmanpuoleisissa kasvaimissa oli erotettavissa selkeästi verrukomikrobien ja fusobakteerien pääjaksot, tosin pieninä määrinä. Molemmen puoleisissa kasvaimissa oli myös havaittavissa aktinobakteerien pääjakso ja yksi tuntematon pääjakso.



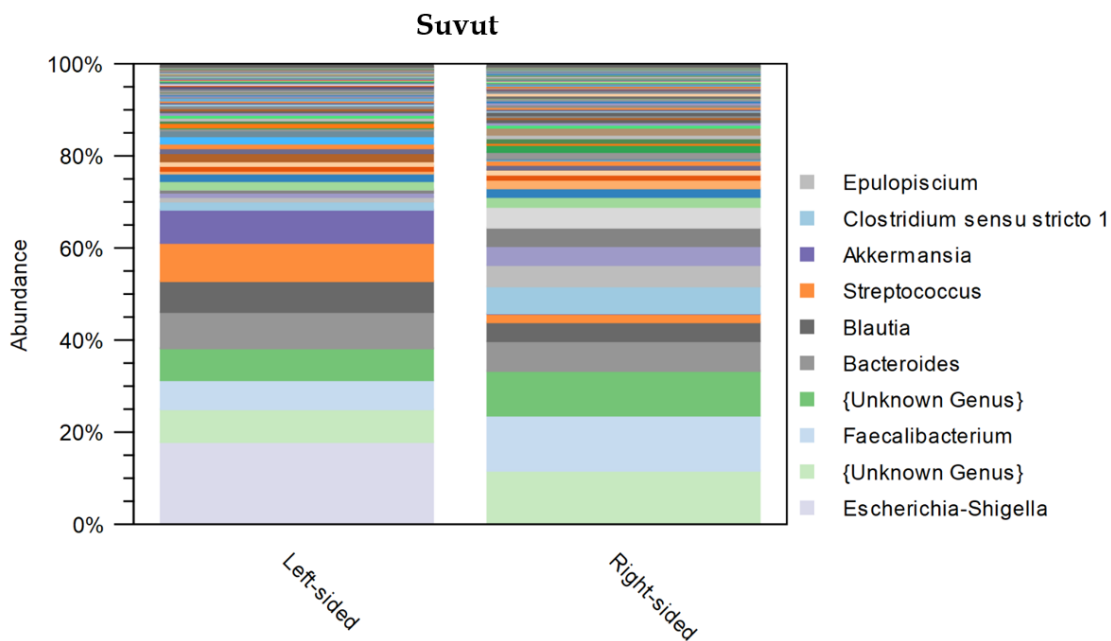
Kuva 11. Keskiarvo vasemman- ja oikeanpuoleisten kasvainten bakteeripääjaksosta.

Oikeanpuoleisissa kasvaimissa heimot *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* 1, *Erysipelotrichaceae* sekä *Burkholderiaceae* esiintyivät keskimääräisesti runsaimmin verrattuna vasemmanpuoleisiin kasvaimiin (kuva 12). Vasemmanpuoleisissa kasvaimissa esiintynyttä *Enterobacteriaceae*- ja *Akkermansiaceae*-heimoja ei havaittu oikeanpuoleisissa kasvaimissa. *Enterobacteriaceae*- ja *Lachnospiraceae*-heimot muodostivat vasemmanpuoleisissa näytteissä suurimmat ryhmät sekä heimon *Ruminococcaceae* esiintyvyys oli kolmanneksi suurin. Yksi tuntematon heimo esiintyi molemmilla puolilla.

Sukujen kirjo kasvainnäytteissä oli runsas (kuva 13). Oikeanpuoleisissa kasvaimissa kolmesta runsaimmasta suvusta vain *Faecalibacterium* oli tunnistettavissa. Vasemmanpuoleisissa kasvaimissa runsain ryhmä oli *Escherichia-Shigella*, joita ei esiintynyt oikeanpuoleisissa kasvaimissa, myös vasemmanpuoleisissa kasvaimissa esiintyvä *Akkermansia*, ei ilmene oikeanpuoleisissa kasvaimissa. Muita bakteerisukuja kasvaimissa olivat *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium sensu stricto* 1 sekä *Epulopiscium*.

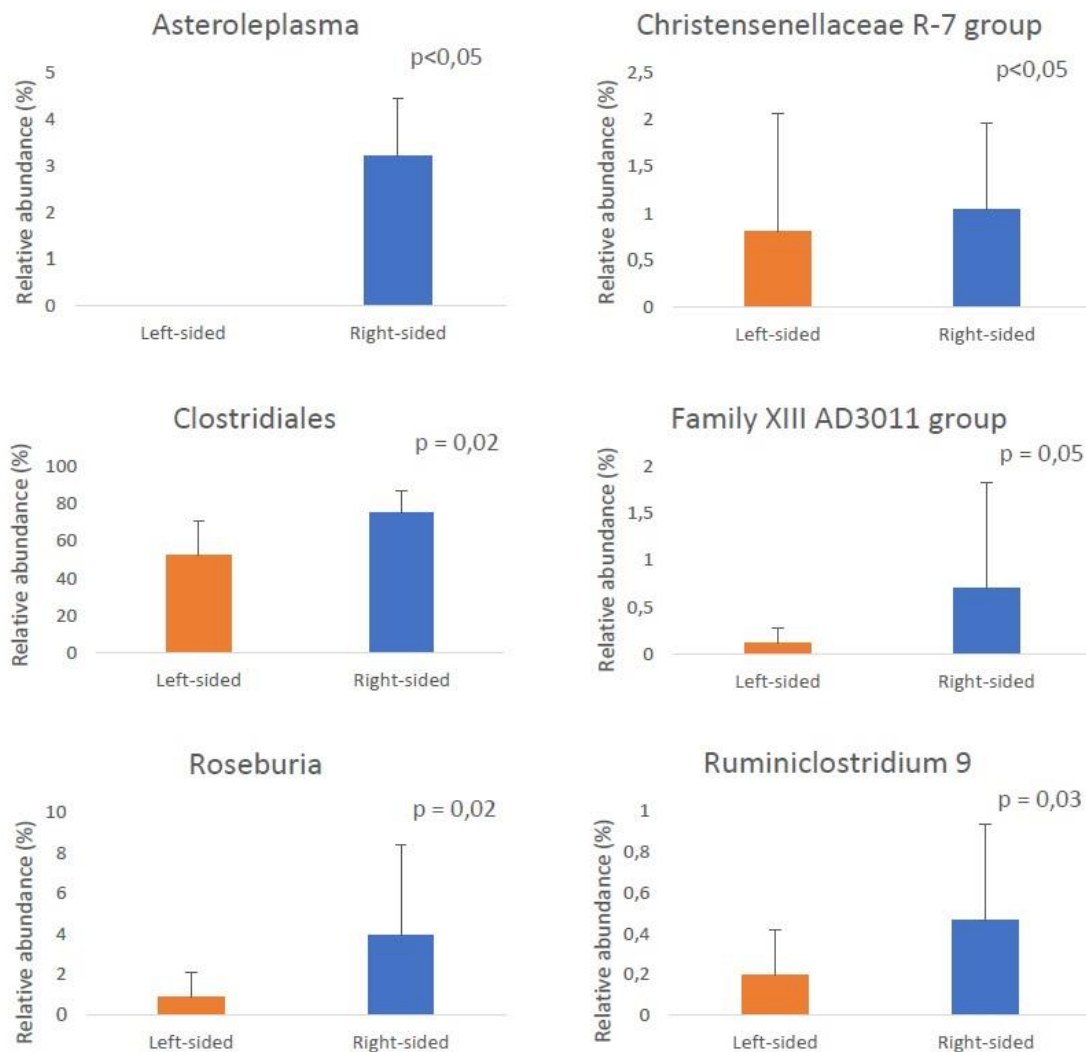


Kuva 12. Kasvainnäytteiden keskiarvolliset kymmenen runsainta bakteeriheimoa.



Kuva 13. Vasemman- ja oikeanpuoleisten kasvainkudoksen keskiarvollisia bakteerisukuja, joista kymmenen runsainta on nimetty.

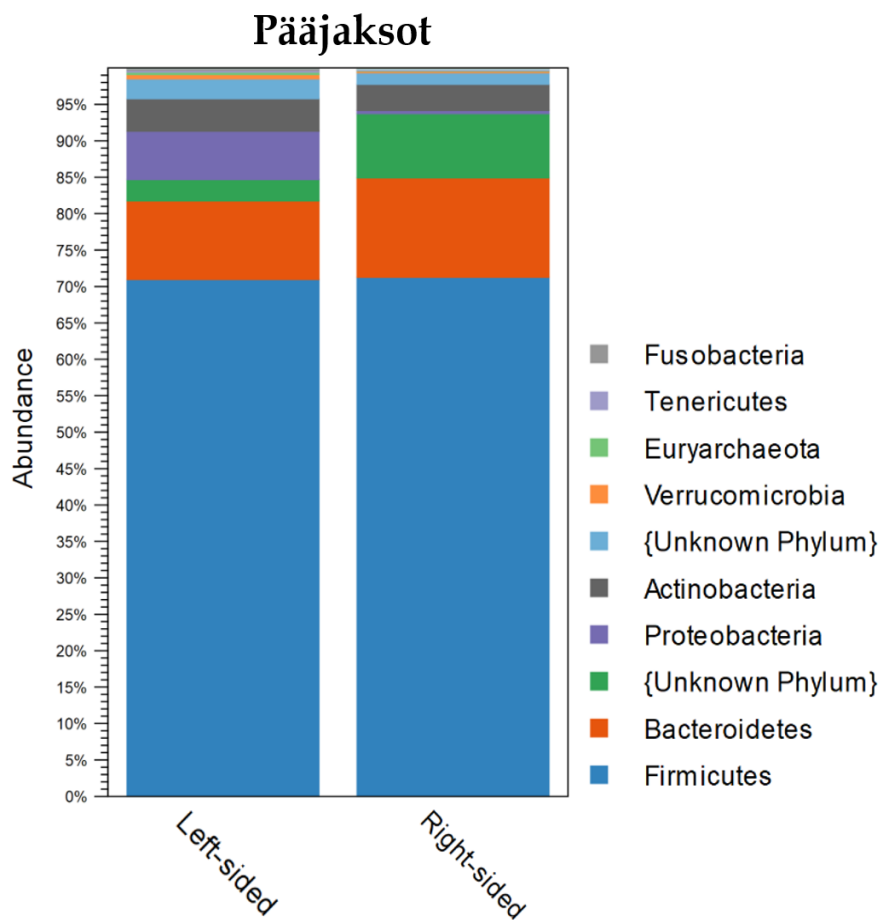
Merkittävä ero vasemman- ja oikeanpuoleisen kasvaimen välillä oli viiden bakteerisuvun runsauden välillä: neljässä *Asteroleplasma* ( $p=0,02$ ;  $p=0,03$ ;  $p=0,04$  &  $p=0,05$ ) ja kahdessa *Christensenellaceae R-7 group* -suvulle kuuluvassa OTU:ssa ( $p=0,03$  &  $p=0,04$ ), sekä, *Family XIII AD3011 group* ( $p=0,05$ ), *Roseburia* ( $p=0,02$ ) ja *Ruminiclostridium 9* ( $p=0,03$ ) -suvuilla; sekä yhdessä bakteerilahkossa *Clostridiales* ( $p=0,02$ ) (kuva 14).



Kuva 14. Suhteellinen prosentiosuus kasvainnäytteiden merkitsevästi eroavista mikrobeista vasemman- ja oikeanpuoleisten kasvaimien välillä.

### 3.1.2 Ulostenäytteiden mikrobikoostumus

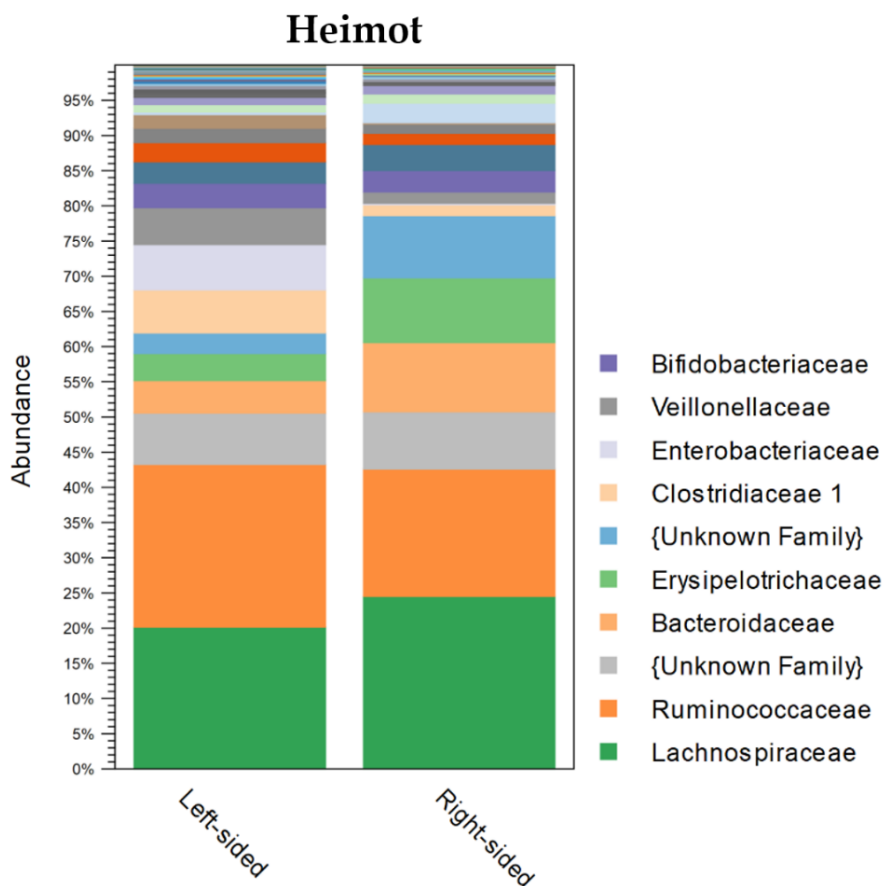
Ulostenäytteitä hallitsi firmikuuttien pääjakso molemmilla potilasryhmillä. Bakteroidien pääjakso oli toiseksi runsain potilailla, huomattavasti pienemmällä prosenttiosuudella verrattuna firmikuuttien määrään. Molemmilla potilasryhmillä oli kaksi tuntematon pääjaksoa. Proteobakteerien pääjakso on selkeämmin havaittavissa vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla, mutta aktinobakteerien pääjaksoa esiintyy lähes yhtä paljon niin vasemman- kuin oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla. Muita pääjaksoja olivat verrukomikrobit, tenerikuutit ja fusobakteerit. Pääjakso *Euryarchaeota* kuuluu arkeonien domeeniin (kuva 15).



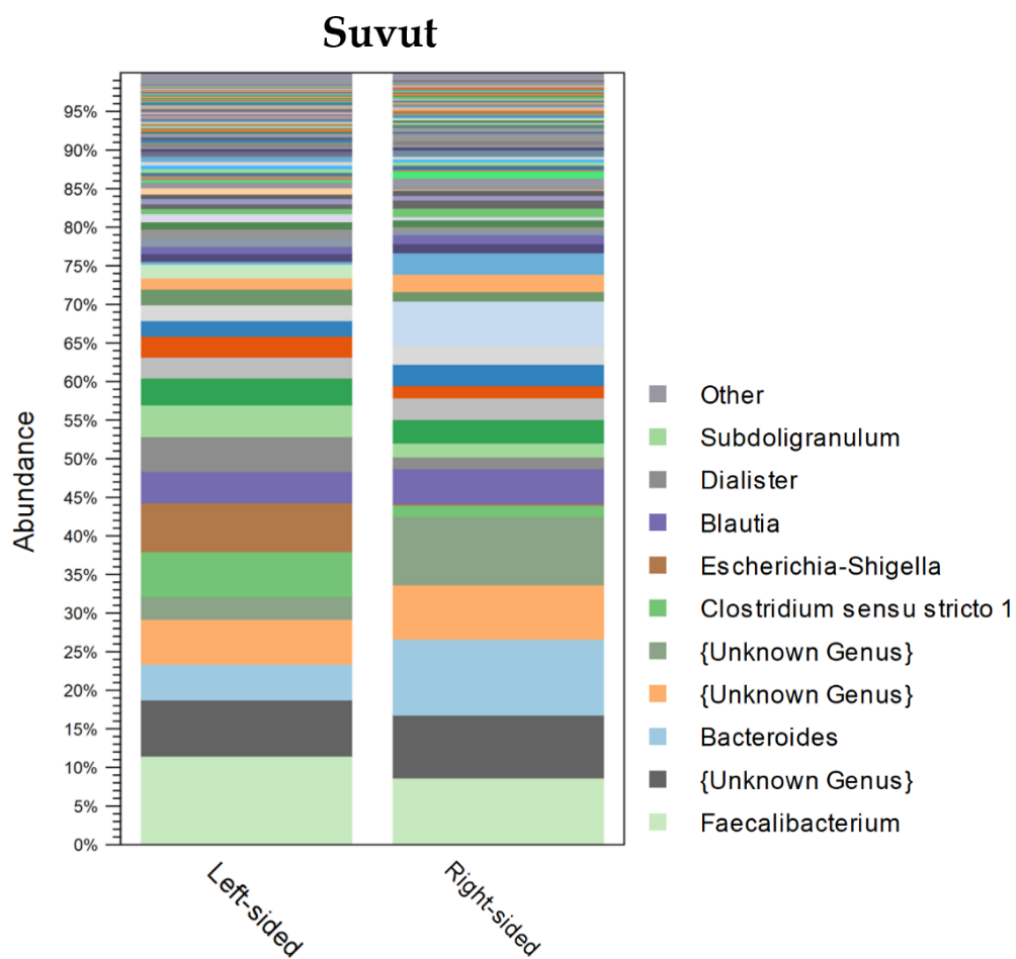
Kuva 15. Ulostenäytteiden keskiarvillisesti runsaimmat bakteeripääjaksot.

Kaksi keskiarvollisesti runsainta heimoa molemmilla potilasryhmillä ulosteissa olivat *Lachnospiraceae* ja *Ruminococcaceae*. Heimot *Bacteroidaceae* ja *Erysipelotrichaceae* esiintyivät runsaimmin oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla, mutta *Clostridiaceae* 1-, *Enterobacteriaceae*- ja *Veillonellaceae*-heimot olivat vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla runsaimpia, myös *Bifidobacteriaceae*-heimon bakteereja esiintyi näytteissä. Kahta heimoa runsaimpien joukossa ei näytteistä tunnistettu (kuva 16).

Molemmilla potilasryhmillä runsaimmista suvuista kolme oli tuntematonta. Vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla runsaimmat tunnistetut suvut olivat *Faecalibacterium*, *Clostridium sensu stricto* 1 ja *Escherichia-Shigella*, joista jälkimmäistä ei juuri ole havaittavissa oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla. Heillä runsaimmat tunnistetut suvut olivat *Bacteroides*, *Faecalibacterium* sekä *Blautia*. Muita runsaimpia sukuja olivat myös *Dialister* ja *Subdoligranulum* (kuva 17).



Kuva 16. Keskiarvo ulostenäytteissä runsaimmin esiintyneistä bakteeriheimoista.

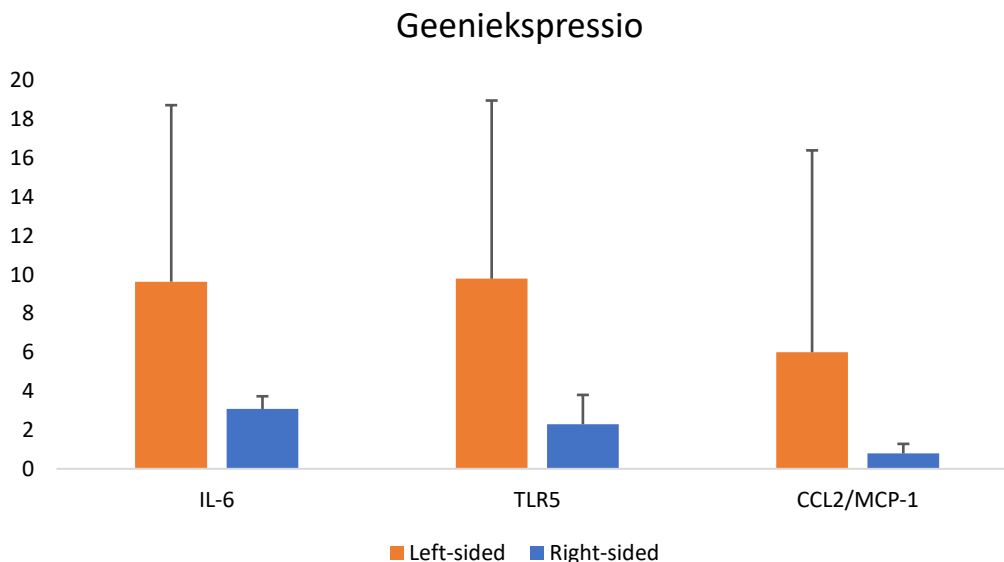


Kuva 17. Ulostenäytteiden keskiarvolliset bakteerisuvut, joista kymmenen runsainta on nimetty.



### 3.2 Tulehdusanalyysit

Merkitsevää eroavaisuutta vasemman- ja oikeanpuoleisen kasvainten välillä ei geeniekspression suhteen havaittu tulehdusanalyysissä (kuva 18).



Kuva 18. Tulehdukseen liittyvien sytokiini IL-6 ja CCL2/MCP-1 sekä TLR5:n geeniekspression eli cDNA-tasojen määrittäminen kasvainnäytteistä.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkielmassa tutkittiin kahdeksan PSS:n potilaan kasvaimen puoleisuuseroja tulehduksen sekä suolistomikrobiston suhteen analysoimalla potilaiden uloste- ja kasvainnäytteitä. Beetadiversiteetti määritettiin Bray-Curtis dissimilariteetti-indeksillä ja PERMANOVA analyysillä. Puoleisuuseroihin liittyen analysoitiin lajien runsaus ja alfadiversiteetti. Vaikka merkittävä puoleisuusero oli vain viiden bakteerisuvun ja yhden bakteerilahkon runsauden suhteen kasvaimissa, on mikrobistossa havaittavissa eroja pääjakson, heimon ja suvun suhteen. Koska geeniekspressiosta tuloksia ei kertynyt, tulosten tarkastelussa käydään läpi löydettyjen mikrobien (taulukko 6) merkitystä PSS:ssä ja mahdollisesti eroja kasvaimien puoleisuudessa.

Ulosteen mikrobikoostumus ei täysin vastaa kasvaimen mikroympäristön mikrobistoa, kuten jo aiemmin on havaittu (Chen ym. 2012, Flemer ym. 2017, Kneis ym. 2023). Tässä tutkielmassa kolme runsainta pääjaksoa niin ulosteessa kuin kasvaimessa ovat firmikuutit, bakteroidit sekä proteobakteerit, ja vain oikeanpuoleisten kasvainten ulostenäytteissä kolmanneksi runsain pääjakso on tuntematon. Runsaimpien pääjakson bakteerien koostumus on hyvin samantapainen muiden tutkimuksen kanssa. Firmikuuttien yliedustettavuus niin oikean- kuin vasemmanpuolen kasvaimen potilailla, on aikaisemmin

yhdistetty PSS:ään (Dejea ym. 2014, Gao ym. 2015, Allali ym. 2018, Phipps 2021). Liu ym. (2020) tosin totesivat, että terveillä firmikuuttien ja bakteroidien pääjaksot ovat rikkaammat ja niiden määrä vähenee vaiheittain PSS:n edetessä. Merkittävämpää saattaa olla firmikuuttien ja bakteroidien keskeinen suhde, luonnehdittaessa suoliston terveyttä ja syövän etenemistä (Sun ym. 2016).

Pääjakson kärkijoukosta puuttuu fusobakteerit, joista *Fusobacterium*-suku, erityisesti laji *Fusobacterium nucleatum*, on yhdistetty PSS:n patogeenisyyteen. Niiden määrän on havaittu olevan runsasta PSS:ää sairastavilla potilailla (Gao ym. 2015, Purcell ym. 2017, Zwinsová ym. 2021, da Costa ym. 2022, Kneis ym. 2023).

## 4.1 Oikeanpuoleiset kasvaimet

Oikeanpuolen kasvaimen potilailla määrällisesti suuremmissa ryhmissä oli tuntemattomia OTU:ja. Kyse voi olla ihmisperäisestä, kuten mitokondrion, DNA:sta. Vaikka suurin heimo oikeanpuolen kasvaimen potilailla on *Lachnospiraceae*, ei oikealla esiintyvistä bakteerisuvuista mikään kuulu kyseiseen heimoon, ja vain *Roseburia* on ainoa tutkielman bakteerisuku, joka siihen kuuluu.

Oikeanpuoleisen kasvaimen ulosteen runsain heimo *Bacteroidaceae* ja siihen kuuluva *Bacteroides*-suku, ovat tutkielman ainoat bakteroideihin kuuluvat bakteerit. *Bacteroides*-sukuun kuuluva enterotoksinen *Bacteroides fragilis* on patogeeninen sen tuottaman *B. fragilis* toksiin (BFT) takia, jota myrkytön (eng. *nontoxigenic*) *B. fragilis* (NTBF) ei tuota (Sears ym. 2014). BFT:n on havaittu lisääntyvän PSS:n potilaiden ulosteessa verrattuna terveisiin yksilöihin (Toprak ym. 2006). Boleijn ym. (2015) tutkimuksessa *bft*-geeni ilmenee 85,7 % vasemmanpuoleisissa ja 91,7 % oikeanpuoleisissa kasvainkudoksen näytteissä, sen määrän lisääntyessä syövän myöhäisemmissä vaiheissa. BFT aiheuttaa oireetonta koliittia (Rhee ym. 2009) ja pystyy laukaisemaan tulehduksen etenemisen suolen epiteelisoluissa, mikä voi johtaa kasvaimen kehitykseen (Wu ym. 2009). BFT:stä on löydetty kolme eri isotyyppeä (Chung ym. 1999), joiden ilmentymiset vaihtelevat PSS:ssä. BFT-1:n on havaittu edistävän herkemmin biofilmin muodostusta, mutta se ei ole välttämätön, sillä myös NTBF-kanta muodostaa biofilmiä suolistossa (Jasemi ym. 2020). Biofilmin muodostus aiheuttaa muutoksia suolen epiteelissä, jotka johtavat onkogeenisyyteen, kuten angiogeneesiä, kasvunrajoitegeenien toiminnan menetys sekä rauhassolujen proliferaatiota (Dejea ym. 2014). PSS:n potilailla, joilla *B. fragilis* ilmenee suolen limakalvolla, on myös kohonnut veren CCL2/MCP-1 arvo (Nardelli ym. 2021).

Oikeanpuoleisen kasvainkudoksen runsain tunnistettu suku on *Faecalibacterium*, joka kuuluu *Ruminococcaceae*-heimoon. *Faecalibacterium* esiintyy myös runsaana oikean- ja vasemmanpuolen kasvaimen potilaiden ulosteessa. Verrattaessa PSS:n potilaiden ja terveiden yksilöiden mikrobiomia keskenään, esiintyy *Faecalibacterium* runsaampana terveillä, joten sillä on vahva negatiivinen yhteys PSS:ään (Wu ym. 2013, Allali ym. 2018, da Costa ym. 2022). Chen ym. (2012) hypotetisoivat suvun olevan probioottinen PSS:ssä. Puoleisuuseroissa suku on kuitenkin tunnistettu merkittävästi runsaampana oikeanpuoleisen

kasvaimen potilaiden suolen limakerroksessa ja ulosteessa (Flemer ym. 2017, Miyake ym. 2021). *Faecalibacterium*-sukuun kuuluvilla bakteereilla ei ole flagellaa (Duncan ym. 2002, Zou ym. 2021). Suvun päälaji *F. prausnitzii* on butyraattia, laktaattia ja formaattia tuottava bakteeri, jonka tuottamat metaboliitit omaavat anti-inflammatorisia ominaisuuksia, estämällä IL-8:n tuotantoa ja NF- $\kappa$ B-signaalireitin aktivoitumista (Duncan ym. 2002, Sokol ym. 2008). Tämä tulehdusta heikentävä ominaisuus saattaa siten hyödyttää kasvainsoluja, sillä immuunipuolustus ei pääse *F. prausnitzii* -bakteerin läsnäollessa käynnistämään vaadittavaa tulehdusreaktiota kasvaimen leviämisen hillitsemiseksi.

## 4.2 Vasemmanpuoleiset kasvaimet

Vasemmanpuoleisissa kasvainkudoksessa esiintyvä, verrukomikrobeihin kuuluva *Akkermansia*-suku esiintyy hyvin vaihtelevasti PSS:n potilailla tutkimuksissa. Sen on havaittu olevan runsas potilailla, joilla on vasemmanpuoleinen tai peräsuolenkasvain (Flemer ym. 2017, Kneis ym. 2023). Suvun on havaittu esiintyvän suurempana kiinalaisten potilaiden kasvainkudoksessa (Sheng ym. 2020) sekä toisaalta vähempänä eteläkorealaisten PSS:n potilaiden kuin terveiden ulosteessa (Park ym. 2021). Sen havaittiin lisääntyvän PSS:n myöhäisemmissä vaiheissa ja metastasoinnissa tšekkiläisillä PSS:n potilailla (Zwinsová ym. 2021). Suvun ainoa tunnettu laji on musiinia energian lähteeksi kuluttava ja flagellaton *Akkermansia muciniphila*. Aineenvaihdunnan tuotteina se vapauttaa propionaattia ja asetaattia (Derrien ym. 2004, Belzer ja de Vos 2012). Näiden lyhytketjuisten rasvahappojen ajatellaan olevan terveydelle suotuisia ja siksi kyseistä bakteeria pidetään biomarkkerina terveestä suolistosta (Belzer ja de Vos 2012). Weirn ym. (2013) tutkimuksessa, laji kuitenkin esiintyy liki nelinkertaisesti suurempana PSS:n potilailla kuin terveillä kontrolleilla. On ilmeistä, että *Akkermansia*-suvun rooli PSS:ssä on vielä ristiriitainen.

Kasvainkudoksessa ilmenevä *Streptococcus* yhdistetään vahvasti PSS:ään. Sen havaitaan lisääntyvän niin potilaiden ulosteessa, kasvainkudoksessa kuin kasvain vapaassa kudoksessa (Wang ym. 2012, Sheng ym. 2020, da Costa ym. 2022). *Streptococcus* käyttää flagellojansa liikkumiseen (Turner ym. 2016). Zwinsová ym. (2021) havaitsivat *Streptococcus*-suvun ilmenevän kasvaintyyppissä, joka esiintyy useammin vasemmalla puolella. *Streptococcus*, *Akkermansia* sekä *Faecalibacterium* esiintyvät runsaina potilailla, joilla on dMMR-kasvain (Jin ym. 2022). MSI-potilaiden mikrobikoostumuksesta *Streptococcus* kattaa 25 % ja *Akkermansia* 20 %, kun mikrosatelliitti-stabiliteetin potilailla vastaavat luvut ovat 8 % ja <1 % (Kneis ym. 2023).

Vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla on selvästi enemmän proteobakteereja niin kasvaimessa kuin ulosteessa, jonka on raportoitu lisääntyvän PSS:ssä (Wang ym. 2011, Zeller ym. 2014), mutta myös olevan vallitseva terveiden suolen kudoksessa (Gao ym. 2015). Tutkielmassa proteobakteereihin kuuluva *Enterobacteriaceae* ja tähän kuuluva *Escherichia-*

*Shigella* ovat vasemmanpuoleisessa kasvainkudoksessa runsaimmat heimo ja suku, jotka ovat erotettavissa myös vasemmanpuoleisen kasvaimen potilaiden ulosteessa, mutta ei lainkaan oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla. Tutkimuksissa *Escherichia-Shigella* ilmenee yleisesti vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla niin uloste- kuin kasvainnäytteissä sekä potilaiden terveessä kudoksessa (Gao ym. 2015, Miyake ym. 2021, Zwinsová ym. 2021). Suku esiintyy normaalisti terveen suolen limakerroksessa. Sen patogeeniset kannat kuitenkin tuottavat proteiineja, jotka aiheuttavat sekä ripulia että veriripulia (Kaper ym. 2004), tulehdusta (Sansoneetti ym. 2000) sekä infektoidujen makrofagien apoptoosia (Zychlinsky ym. 1992). Niiden tuottama Toksiini CDT (eng. *cytolethal distending toxin*) aiheuttaa vaurioita isännän DNA:han (Jinadasa ym. 2011). *Shigella*-lajit ja enteroinvasiivinen *E. coli* (EIEC) putoavat taksonomisesti samaan lajiin (Pupo ym. 2000, Kaper ym. 2004). Ne ovat geneettisesti ja patogeenisesti hyvin samankaltaisia keskenään ja niiden taudinaiheuttamiskyky on samanlainen (Kaper ym. 2004). Tämän takia EIEC ja *Shigella* ovat *Escherichia-Shigella*. Pitkään ajateltiin, että niin *Shigella* kuin EIEC ovat liikkumiskyvyttömiä, mutta *Shigella* omaa 2–3 flagellaa ja EIEC epätavallisen suuren flagellan, joilla tunkeutua limakalvon epiteelisoluihin (Girón 1995, Andrade ym. 2002).

Ulostessa esiintyvä *Veillonellaceae*-heimoon kuuluva *Dialister* esiintyy runsaampana vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla. Se joko yhdistetään PSS:ään (Osman ym. 2021, Gao ym. 2017) tai havaitaan suurempina määrinä PSS:n potilailla (Park ym. 2021). Suvun kaksi lajia ovat molemmat liikuntakyvyttömiä (Moore ja Moore 1994, Downes ym. 2003) suun bakteereita, joista *D. invisus* esiintyy juurikanavassa hammasytimen kudoksen tulehduksessa (Downes ym. 2003) ja *D. pneumosintes* hampaan kiinnityskudoksen tulehduksessa (Ghayoumi ym. 2002). *D. pneumosintes* havaitaan runsaana PSS:n potilailla (Chen ym. 2012) ja potilaiden kasvainkudoksessa, joiden syöpä on pitkälle edennyt (Osman ym. 2011). *D. invisus* on luonnehdittu reagoimattomaksi bakteeriksi, joka ei kykene käyttämään hiilihydraatteja energianlähteenä (Downes ym. 2003). IBD-potilaiden suolistossa *D. invisus* on havaittu olevan lepotilassa (Schirmer ym. 2018). Kun Weir ym. (2013) vertasivat terveiden koehenkilöiden ja PSS:n potilaiden ulostetta, molemmat lajit esiintyivät runsaampana terveillä.

Taulukko 6. Tutkielman suolistomikrobit, jaettuna heimoihin, lahkoon ja pääjaksoihin.  
 \*=kasvainnäytteiden merkittävät mikrobit.

Suku	Heimo	Lahko	Pääjakso
	<i>Erysipelotrichaceae</i>		Firmikuutit
<i>Family XIII AD3011 group*</i>	<i>Anaerovoracaceae</i>		
<i>Dialister</i>	<i>Veillonellaceae</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcaceae</i>		
<i>Blautia</i>		<i>Clostridiales*</i>	
<i>Ruminiclostridium 9*</i>			
<i>Subdoligranulum</i>			
<i>Epulopiscium</i>			
<i>Faecalibacterium</i>	<i>Ruminococcaceae</i>		
<i>Christensenellaceae R-7 group*</i>	<i>Christensenellaceae</i>		
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	<i>Clostridiaceae</i>		
<i>Roseburia*</i>	<i>Lachnospiraceae</i>		
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroidaceae</i>		Bakteroidit
	<i>Burkholderiaceae</i>		Proteobakteerit
<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>		
<i>Asteroleplasma*</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>		Tenerikuutit
<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansiaceae</i>		Verrukomikrobit
	<i>Bifidobacteriaceae</i>		Aktinobakteerit
			Fusobakteerit
			Syanobakteerit
			Asidobakteerit
			<i>Euryarchaeota</i>

### 4.3 Kasvainnäytteiden merkittävästi eroavat mikrobit

Kasvainnäytteissä merkittävä puoleisuus ero on viiden bakteerisuvun ja yhden lahkon suhteen, jotka esiintyvät suurempina määrinä oikeanpuolen kasvaimissa. Firmikuutteihin kuuluva *Clostridiales*-lahkon tiettyjen bakteerien on raportoitu olevan yhteydessä PSS:ään (Wirbel ym. 2019). Lahkoon kuuluvia bakteerilajeja on tunnistettu vasemmanpuoleisen kasvaimen potilaiden ulostenäytteistä (Suga ym. 2022) sekä kasvainnäytteissä, esimerkiksi *Clostridiales vadinBB60 group* on havaittu olevan korkeampi niin kasvain kudoksessa (Zwinsová ym. 2021) kuin kudoksessa, joka ei ole yhteydessä kasvaimen (Phipps ym. 2021). Lahkon kaikki bakteerit ovat flagelloituja ja siihen kuuluu myös butyraattia tuottavia bakteereja, minkä ajatellaan edistävän terveyttä ihmisen suolistossa (Louis ja Flint 2008), siksi niitä pidetään suotuisina mikrobeina (Estaki ym. 2016).

Tutkielmassa *Clostridiales*-lahkoon kuuluva *Lachnospiraceae* esiintyy runsaimpina heimona oikeanpuoleisten kasvaimien potilailla niin uloste- kuin kasvainnäytteissä sekä on yksi suurimmista heimoista myös vasemmanpuoleisen kasvaimen potilailla. Heimoon kuuluva *Roseburia* on havaittu olevan yksi ydin mikrobeista vasemmanpuoleisissa kasvaimissa (Flemer ym. 2017, Kneis ym. 2023). Osassa tutkimuksissa sen määrä väheni PSS:n potilaiden ulostenäytteissä verrattuna terveisiin (Wang ym. 2012, Wu ym. 2013). *Roseburia*-suvun bakteerit tuottavat lyhytketjuisia rasvahappoja (Louis ja Flint 2008) ja butyraattia sekä ovat erityisen liikkumiskykyisiä 37 °C:ssa, omaten useita flagelloja (Stanton ym. 2015). Toisaalta sen bakteerilajien ajatellaan kykenevän ehkäisemään (Ghidini ym. 2018) ja suojaavan PSS:ltä (Wang ym. 2012, Wu ym. 2013) sekä suojaavan suun patogeeneiltä (Flemer ym. 2018). Montalban-Arques ym. (2021) huomasivat hiirikokeessaan, että neljän *Clostridiales* bakteerilajin sekoitus, *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium hallii* sekä *Anaerostipes caccae*, oraalisesti annettuna ehkäisi ja toimi hoitokeinona, CD8<sup>+</sup> T-solujen kautta, jo muodostuneiden kasvaimien hoidossa PSS:ssä sekä rintasyövässä, keuhkosyövässä ja melanoomassa. He havaitsivat, että kyseiset butyraattia tuottavat lajit ovat useissa tutkimuksissa vähentyneet PSS:n potilailta, niiden nauttiminen muutti suoliston mikrobikoostumusta siten, että *Ruminococcaceae*- ja *Lachnospiraceae*-heimoon kuuluvien lajien määrä lisääntyi.

Tenerikuuttien pääjaksoon kuuluva *Asteroleplasma* on harvoin raportoitu bakteerisuku ja sen rooli tai vaikutus ihmisen suolistossa on tuntematon. Se kuitenkin on liikkumiskyvytön, eli ei omaa flagellaa (Brown ym. 2015, Qian ym. 2018). Sen on ehdotettu olevan indikaattori terveestä mikrobiomista suolistossa, sillä häiriöt suvun lajien levinneisyydessä on yhdistetty haavaiseen koliittiin (Willing ym. 2010, Krych ym. 2013). Qian ym. (2018) tekemässä tutkimuksessa selvitettiin korkea- ja matalarasvaisen ruokavalion vaikutusta suolistomikrobistoon kiinalaisilla. *Asteroleplasma* on havaittavissa matalarasvaista ruokavaliota noudattavilla yksilöillä, mutta ei niillä yksilöillä, joiden ruokavalio luokiteltiin korkearasvaiseksi.

Firmikuutteihin ja *Anaerovoracaceae*-heimoon kuuluva *Family XIII AD3011 group* -suku korreloi positiivisesti tulehdussytokiinin IL6:n kanssa Li ym. (2022) hiirikoe tutkimuksessa muiden bakteerisukujen kanssa, joiden ajatellaan olevan haitallisia IBD:n patogeneesissä. PSS:ään liittyen, *Family XIII AD3011 group* esiintyvyys on matalampi PSS:n potilaiden ulosteessa kuin terveillä verrokeilla (Park ym. 2021). Toisaalta bakteerisuku yhdistettiin syöpään liittyvään uupumukseen pää- ja niskasyöpä potilailla (Xiao ym. 2021), mutta hiirikokeissa *Family XIII AD3011 group* esiintyvyys on yhdistetty paksusuolen tulehdukseen ja syöpään (Zhang ym. 2018). Sitä on myös ehdotettu biomarkkeriksi koliittiin liittyvässä PSS:ssä (Wang ym. 2022).

Heimo *Christensenellaceae* on verrattain uusi, sillä se eristettiin vasta vuonna 2012 terveen japanilaisen miehen ulosteesta. Paksusuolella *Christensenellaceae* fermentoi erityyppisiä hiilihydraatteja tuottaen lyhytketjuisia rasvahappoja, ja on liikkumiskyvytön (Morotomi ym. 2012). PSS:n tutkimuksissa Amerikanafrikalaisilla heimo on runsaampi PSS:n potilailla kuin terveillä

(Yazici ym. 2017). Burns ym. (2018) havaitsivat heimon olevan yhteydessä kasvaimen mutaatioprofiiliin PSS:ssä, sen ollessa matala APC-mutaation, mutta korkeampi ZNF717-mutaation kasvaimissa. Heimoon kuuluvan bakteerisuvun *Christensenellaceae R-7 group* on havaittu lisääntyvän vasemmanpuoleisen kasvaimen potilaiden suolen limakalvolla (Zwinsová ym. 2021). Sukua pidetään myös potentiaalisena biomarkkerina neoplasian alkuvaiheissa, sillä määrän havaittiin kasvavan adenooma-potilailla verrattuna terveisiin. *Ruminiclostridium 9* -suvun bakteerit voisivat olla myös syövän alkuvaiheen indikaattoreita (Wu ym. 2021). Wang ym. (2022) ehdottivat, että suku voisi toimia biomarkkerina ennustaen koliittiin liittyvän PSS:n etenemistä. Hiirikokeissa *Ruminiclostridium*-bakteerien määrä lisääntyi probiootin käytöstä PSS:n varhaisessa vaiheessa, bakteerien tuottaessa lyhytketjuisia rasvahappoja, sen ajatellaan olevan hyödyllinen (da Silva Duarte ym 2020).

#### 4.4 Tulehdusanalyysit

Geeniekspression suhteen ei merkitsevää eroavaisuutta tulehdustekijöissä ollut oikean- ja vasemmanpuoleisten kasvainten välillä. Tämä johtuu todennäköisesti pienestä otoskoosta sekä näytteidenvälisestä suuresta hajonnasta. Tätä tulisikin tutkia suuremmalla otoskoolla, jotta mahdolliset eroavaisuudet tulevat esiin.

## 5 PÄÄTELMÄT

Tässä tutkielmassa ei lisääntyneitä geeniekspression ilmentymistä potilailla pystytty selvittämään, mutta flagelloituja bakteerisukuja löytyi, vaikkakaan kaikki flagelloidut bakteerit eivät muodosta biofilmiä. Toisaalta näiden bakteerien esiintymistä suurempina määrinä oikeanpuoleisen kasvaimen potilailla ei voi selkeästi rajata, sillä flagelloituja ja flagelloimattomia bakteerisukuja esiintyy suurimmissa ryhmissä niin oikean- kuin vasemmanpuolen kasvaimen potilailla. Kaksi tutkielman tunnistetuista suvuista, *Roseburia* ja *Bacteroides*, joiden tiedetään olevan patogeenisia flagelloidensa takia, esiintyvät kuitenkin runsaimpina oikeanpuolen kasvaimen potilailla, joilla flagelliinin ilmentyminen aiheuttaa vakavampaa tulehduksellista tilaa.

Bakteerisuvut PSS:ssä ja sen puoleisuuksissa varioivat tutkimusten välillä huomattavasti. Harvan bakteerin suhteen, mitkä kertovat suoliston neoplasiasta, tutkimukset näyttävän olevan yksimielisiä. Pelkkä mikrobien tunnistaminen potilaiden ulosteesta tai kasvaimen mikroympäristöstä ei edesauta syiden selvittämistä siihen, mitkä lajit mahdollisesti ilmenevät PSS:ssä. Bakteerein vaihtelevaan esiintymiseen PSS:ssä vaikuttaa selvästi isännän perimä, kasvaimen mutaatioprofiili, joissakin tapauksissa muut suolistomikrobit sekä neoplasian asteittainen eteneminen: terve-polyyppi-adenooma-adenokarsinoma.

Lisää dataa tarvitaankin mikrobiston koostumuksesta PSS:ssä, etenkin kasvaimien puoleisuudessa sekä siitä mitkä muuttujat kasvaimen mikroympäristössä voisivat olla yhteinen tekijä sille, onko bakteeri haitallinen,

hyödyllinen, neutraali tai jopa luotettava biomarkkeri tai indikaattori neoplasiasta.



## KIITOKSET

Lopuksi haluan kiittää tohtorikoulutettavaa Elina Mäkistä avusta työvaiheissa ja pooli sekvensoinnin suorittanutta erikoislaboratoriomestaria Elina Virtasta. Erityisen iso kiitos ohjaajalleni dosentti Satu Pekkaselle, erittäin jänteikkäästä kärsivällisyydestä ja neuvoista tutkielman edistämiseksi.

Jyväskylässä 9.4. 2024  
Jenni Lainio

## KIRJALLISUUSLUETTELO

- Aas J., Paster B., Stokes L., Olsen I. & Dewhirst F. 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol.* 43: 5721–5732.
- Allali I., Boukhatem N., Bouguenouch L., Hardi H., Boudouaya A., Cadenas B., Ouldin K., Amzazi S., Azcarate-Peril A. & Ghazal H. 2018. Gut microbiome of Moroccan colorectal patients. *Med Microbiol Immunol.* 207: 211–225.
- Andersson A., Lindberg M., Jakobsson H., Bäckhed F., Nyrén P. & Engstrand L. 2008. Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PloS ONE.* 3, 7, doi:10.1371/journal.pone.0002836.
- Andrade A., Girón J., Amhaz J., Trabulsi L. & Martinez M. 2002. Expression and Characterization of Flagella in Nonmotile Enteroinvasive *Escherichia coli* Isolated from Diarrhea Case. *Infect Immun.* 70: 5882–5886.
- Arnold M., Sierra M., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. & Bray F. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 66: 683–691.
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D., Fernandes G., Tap J., Bruls T., Batto J., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H., Nielsen T., Pons N., Poulain J., Qin J., Sicheritz-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E., Wang J., Guarner F., Pedersen O., de Vos W., Brunak S., Doré J., MetaHIT Consortium, Weissenbach J., Ehrlich S. & Bork P. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Microb Biotechnol.* 4: 550–553.
- Ashizawa T., Okada O., Suzuki Y., Takagi M., Yamazaki T., Sumi T., Aoki T. & Aoki T. 2006. Study of Interleukin-6 in the Spread of Colorectal Cancer: The Diagnostic Significance of IL-6. *Acta Med Okayama.* 60: 325–330.
- Baier P., Eggstein S., Wolf-Vorbeck G., Baumgartner U. & Hopt U. 2005. Chemokines in Human Colorectal Carcinoma. *Anticancer Res.* 25: 3581–3584.
- Bailey C., Negus R., Morris A., Ziprin P., Goldin R., Allavena P., Peck D. & Darzi A. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis.* 24: 121–130.
- Barault L., Charon-Barran C., Jooste V., de la Vega M., Martin L., Roinot P., Rat P., Bouvier A., Laurent-Puig P., Faivre J., Chapusto C. & Piard F. 2008. Hypermethylator Phenotype in Sporadic Colon Cancer: Study of a Population-Based Series of 582 Cases. *Cancer Res.* 68: 8541–8546.
- Baxter N., Ruffin M., Rogers M. & Schloss P. 2016. Microbiota-based model improves the sensitivity of fecal immunochemical test for detecting colonic lesions. *Genome Med.* 8, 37, doi:10.1186/s13073-016-0290-3.
- Beart R., Melton J., Maruta M., Dockerty M., Frydenberg H. & O'Fallon W. 1983. Trends in Right and Left-sided Colon Cancer. *Dis Colon Rectum.* 26: 393–398.

- Belas R. 2013. When the swimming gets tough, the tough form biofilm. *Mol Microbiol.* 90, 1, doi:10.1111/mmi.12354.
- Bernstein C., Blanchard J., Kliever E. & Wajda A. 2001. Cancer Risk in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Cancer* 91: 854–862.
- Bik E., Eckburg P., Gill S., Nelson K., Purdomi E., Francois F., Perez-Perez G., Blaser M. & Relman D. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *PNAS.* 103: 732–737.
- Bohnhorst J., Rasmussen T., Moen S., Fløttum M., Børset M., Espevik T. & Sundan A. 2006. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia.* 20: 1138–1144.
- Boleij A., Hechenbleikner E., Goodwin A., Badani R., Stein E., Lazarev M., Ellis B., Carroll K., Albesiano E., Wick E., Platz E., Pardoll D. & Sears C. 2015. The *Bacteroides fragilis* Toxin Gene Is Prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients. *Clin Infect Dis.* 60: 208–215.
- Borello M., Alberti L., Fischer A., Degl'Innocenti D., Ferrario C., Gariboldi M., Marchesi F., Allavena P., Greco A., Collini P., Pilotti S., Cassinelli G., Bressan P., Fugazzola L., Mantovani A. & Pierotti M. 2005. Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the *RET/PTC1* oncogene. *PNAS.* 102: 14825–14830.
- Bray F. 2014. *Transitions in human development and the global cancer burden.* IRAC World Cancer Report, EN, saatavissa <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>.
- Brennan C. & Garrett W. 2016. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol.* 70: 395–411.
- Brown D., Bradbury J. & Johanson K. 2015. *Asteroleplasma.* Teoksessa: Bergey's Manual Trust (toim.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria,* Wiley, doi:10.1002/9781118960608.gbm01258.
- Bufill J. 1990. Colorectal Cancer: Evidence for Distinct Genetic Categories Based on Proximal or Distal Tumor Location. *Ann Intern Med.* 113: 779–788.
- Burns M., Lynch J., Starr T., Knights D. & Blekhman R. 2015. Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med.* 7, 55, doi:10.1186/s13073-015-0177-8.
- Burns M., Montassier E., Abrahante J., Priya S., Niccum D., Khoruts A., Starr T., Knights D. & Blekhman R. 2018. Colorectal cancer mutational profiles correlate with defined microbial communities in the tumor microenvironment. *PLoS Genet.* 14, 6, doi:10.1371/journal.pgen.1007376.
- Cai Z., Sanchez A., Shi Z., Zhang T., Liu M. & Zhang D. 2011. Activation of Toll-Like Receptor 5 on Breast Cancer Cells by Flagellin Suppresses Cell Proliferation and Tumor Growth. *Cancer Res.* 71: 2466–2475.
- Chen W., Liu F., Ling Z., Tong X. & Xiang C. 2012. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE.* 7, 6, doi:10.1371/journal.pone.0039743.

- Choi S., Chung J., Cho M., Park D. & Choi S. 2021. Analysis of changes in microbiome compositions related to the prognosis of colorectal cancer patients based on tissue-derived 16S rRNA sequences. *J Trans Med.* 19, 485, doi:10.1186/s12967-021-03154-0.
- Chung G., Franco A., Wu S., Rhie G., Cheng R., Oh H. & Sears C. 1999. Identification of a Third Metalloprotease Toxin Gene in Extraintestinal Isolates of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun.* 67: 4945–4949.
- Claesson M., Cusack S., O’Sullivan O., Greene-Diniz R., Weerd H., Flannery E., Marchesi J., Falush D., Dinan T., Fitzgerald G., Stanton C., Sinderen D., O’Connor M., Harnedy N., O’Connor K., Henry C., O’Mahony D., Fitzgerald A., Shanahan F., Twomey C., Hill C., Ross R. & O’Toole P. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *PNAS.* 108: 4586–4591.
- Cremonesi E., Governa V., Garzon J., Mele V., Amicarella F., Muraro M., Trella E., Galati-Fournier V., Oertli D., Däster S., Drosler R., Weixler B., Bolli M., Rosso R., Nitsche U., Khanna N., Egli A., Keck S., Slotta-Huspenina J., Terracciano L., Zajac P., Spagnoli G., Eppenberger-Castori S., Janssen K., Borsig L. & Iezzi G. 2018. *Gut.* 67: 1984–1994.
- da Costa C., Vieira P., Mendes-Rocha M., Pereira-Marques J., Ferreira R. & Figueiredo C. 2022. The Tissue-Associated Microbiota in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cancers (Basel)* 12, 14, doi:10.3390/cancers14143385.
- da Silva Duarte V., dos Santos Cruz B., Tarrach A., Dias R., de Paula Dias Moreira L., Lemos Junior W., Fidélis Silva L., Rocha Santana G., Licursi de Oliveira L., Gouveia Peluzio M., Mantovani H., Corich V., Giacomini A. & de Paula S. 2020. Chemoprevention of DMH-Induced Early Colon Carcinogenesis in Male BALB/c Mice by Administration of *Lactobacillus Paracasei* DTA81. *Microorganisms* 8, 10994, doi:10.3390/microorganisms8121994.
- David L., Maurice C., Carmody R., Gootenberg D., Button J., Wolfie B., Ling A., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M., Biddinger S., Dutton R. & Trunbaugh P. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505: 559–563.
- Dejea C., Wick E., Hechbleikner E., White J., Welch J., Rosetti B., Peterson S., Snesrud E., Borisy G., Lazarev M., Stein E., Vadivelu J., Roslani A., Malik A., Wanyiri J., Goh K., Thevambiga I., Fu K., Wan F., Llosa N., Housseau F., Romans K., Wu X., McAllister F., Wu S., Vogelstein B., Kinzler K., Pardoll D. & Sears C. 2014. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *PNAS.* 111: 18321–18326.
- Derrien M., Vaughan E., Plugge C. & de Vos W. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 1469–1476.
- Downes J., Munson M. & Wade W. 2003. *Dialister invisus* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53: 1937–1940.

- Downes J., Munson M. & Wade W. *Dialister invisus* sp., isolated from the human oral cavity. 2003. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53: 1937–1940.
- Duncan S., Hold G., Harmsen H., Stewart C. & Flint H. 2002. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 2141–2146.
- Duvallet C., Gibbons S., Gurry T., Irizarry R. & Alm E. 2017. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *J Nat Commun.* 8, 1784, doi:0.1038/s41467-017-01973-8.
- Eaves-Pyles T., Murthy K., Liaudet L., Virág L., Ross G., Soriano F., Szabó C. & Salzman A. 2001. Flagellin, a Novel Mediator of *Salmonella*-Induced Epithelial Activation and Systemic Inflammation: I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation, Induction of Nitric Oxide Synthase, Induction of Proinflammatory Mediators, and Cardiovascular Dysfunction. *J Immunol.* 166: 1248–1260.
- Eckburg P., Bik E., Bernstein C., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S., Nelson K. & Relam D. 2005. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308: 1635–1638.
- Estaki M., Pither J., Baumeister P., Little J., Gill S., Ghosh S., Ahmadi-Vand Z., Marsden K. & Gibson D. 2016. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* 4, 42, doi:10.1186/s40168-016-0189-7.
- Feng S., Li Z., Ye Q., Xue T. & Yan B. 2023. Postoperative serum interleukin-6 levels correlate with survival in stage I-III colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 23, 156, doi:10.1186/s12876-023-02800-9.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D., Forman D. & Bray F. 2014. Cancer incident and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *IJC.* 136: E359–E386.
- Flemer B., Lynch D., Brown J., Jeffery I., Ryan F., Claesson M., O’Riordain M., Shanahan F. & O’Toole P. 2017. Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut.* 66: 633–643.
- Flemer B., Warren R., Barrett M., Cisek K., Das A., Jeffery I., Hurley E., O’Riordain M., Shanahan F. & O’Toole P. 2018. The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut* 67: 1454–1463.
- Ganesh K., Stadler Z., Cercek A., Mandelsohn R., Shia J., Segal N. & Diaz Jr L. 2019. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 16: 361–375.
- Gao R., Kong C., Huang L., Li H., Qu X., Liu Z., Lan P., Wang J. & Qin H. 2017. Mucosa-associated microbiota signature in colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36: 2073–2083.
- Gao Z., Guo B., Gao R., Zhu Q., Qin H. 2015. Microbiota dysbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol.* 6, 20, doi:10.3389/fmicb.2015.00020.
- Gewirtz A., Navas T., Lyons S., Godowski P. & Madara J. 2001. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J Immunol.* 167: 1882c1885.

- Ghayoumi N., Chen C. & Slots J. 2002. *Dialister pneumosintes* a new putative periodontal pathogen. *J Periodont Res.* 37: 75–78.
- Ghidini M., Petrelli F. & Tomasello G. 2018. Right Versus Left Colon Cancer: Resectable and Metastatic Disease. *Curr Treat Options Oncol.* 19, 31, doi:10.1007/s11864-018-0544-y.
- Girón J. 1995. Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Mol Microbiol.* 18: 63–75.
- Glebov O., Rodriguez L., Nakahara K., Jenkins J., Cliatt J., Humbyrd C., DeNobile J., Soballe P., Simon R., Wright G., Lynch P., Patterson S., Lynch H., Gallinger S., Buchbinder A., Gordon G., Hawk E. & Kirsch I. 2003. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene Expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12: 755–762.
- Hanahan D. & Weinberg R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 646–674.
- Hayashi F., Smith K., Ozinsky A., Hawn T., Yi E., Goodlett D., Eng J., Akira S., Underhill D. & Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.
- Hayashi H., Takahashi R., Nishi T., Sakamoto M. & Benno Y. 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colon microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol.* 54: 1093–1101.
- He Y., Wu W., Zheng H., Li P., McDonald D., Sheng H., Chen M., Chen Z., Ji G., Zheng Z., Mujagond P., Chen X., Rong Z., Chen P., Lyu L., Wang X., Wu C., Yu N., Xu Y., Yin J., Raes J., Knight R., Ma W. & Zhou H. 2018. Regional variation limits of healthy gut microbiome reference ranges and disease models. *Nat Med.* 24: 1532–1535.
- Hemminki K., Santi I., Weires M., Thomsen H., Sundquist J. & Bermejo J. 2010. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC Cancer* 10: 688.
- Huse S., Ye Y., Zhou Y. & Fodor A. 2012. A Core Human Microbiome as Viewed through 16 rRNA Sequence Clusters. *PLoS One.* 7, 6, doi:10.1371/journal.pone.0034242.
- Hutchins G. Southward K., Handley K., Magill L., Beaumont C., Stahlschmidt J., Richman S., Chambers P., Seymour M., Kerr D., Gray R. & Quirke P. 2011. Value of Mismatch Repair, *KRAS*, and *BRAF* Mutations in Predicting Recurrence and Benefits From Chemotherapy in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 29: 1261–1270.
- Iacopetta B. 2002. Are There Two Sides to Colorectal Cancer? *Int J Cancer.* 101: 403–408.
- Jasemi S., Emaneini M., Fazeli M., Ahmadinejad Z., Nomanpour B., Heravi F., Sechi L. & Feizabadi M. 2020. Toxigenic and non-toxigenic patterns I, II and III and biofilm-forming ability in *Bacteroides fragilis* strains isolated from patients diagnosed with colorectal cancer. *Gut Pathog.* 12, 28, doi:10.1186/s13099-020-00366-5.

- Jess T., Rungoe C. & Peyrin-Biroulet L. 2012. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 10: 639–645.
- Jin M., Wu J., Shi L., Zhou B., Shang F., Chang X., Dong X., Deng S., Liu L., Cai K., Nie X., Zhang T., Fan J. & Liu H. 2022. Gut microbiota distinct between colorectal cancers with deficient and proficient mismatch repair: A study of 230 CRC patients. *Front Microbiol.* 13, 13, doi:10.3389/fmicb.2022.993285.
- Jinadasa R., Bloom S., Weiss R. & Duhamel G. 2011. Cytotoxic distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* 157: 1851–1875.
- Johnson C., Wei C., Ensor J., Smolenski D., Amos C., Levin B. & Berry D. 2013. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* 24: 1207–1222.
- Jones S., Chen W., Parmigiani G., Diehl F., Beerenwinkel N., Antal T., Traulsen A., Nowak M., Siegel C., Velculescu V., Kinzler K., Vogelstein B., Willis J. & Markowitz S. 2007. Comparative lesion sequencing provides insight into tumor evolution. *PNAS.* 105: 4283–4288.
- Jussila A., Virta L., Pukkala E. & Färkkilä M. 2013. Malignancies in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide register study in Finland. *Scand J Gastroenterol.* 48: 1405–1413.
- Kaper J., Nataro J. & Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2: 123–140.
- Kaz A., Wong C., Dzieciatkowski S., Luo X., Echoen R. & Grady W. 2014. Patterns of DNA methylation in the normal colon vary by anatomical location, gender, and age. *Epigenetics* 9: 492–502.
- Kim H., Jen J., Vogelstein B. & Hamilton S. 1994. Clinical and Pathological Characteristic of Sporadic Colorectal Cancer with DNA Replication Errors in Microsatellite Sequences. *Am J Pathol.* 145: 148–156.
- King C., Desai H., Sylvetsky A., LoTempio J., Ayanyan S., Carrie J., Crandall K., Fochtman B., Gasparyan L., Gulzar N., Howell P., Issa N., Krampis K., Mishra L., Morizono H., Pisegna J., Rao S., Ren Y., Simonyan V., Smith K., VedBrat S., Yao M. & Mazumder R. 2019. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PloS ONE.* 14, 9, doi:10.1371/journal.pone.0206484.
- Kinzler K. & Vogelstein B. 1996. Lesson from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87: 159–170.
- Kneis B., Writz S., Weber K., Denz A., Gitter M., Geppert C., Brunner M., Krautz C., Siebenhüner A., Schierwagen R., Tyc O., Agaimy A., Grützmann R., Trebicka J., Kresting S. & Langheinrich M. 2023. Colon Cancer Microbiome Landscaping: Differences in Right- and Left-Sided Colon Cancer and a Tumor Microbiome-Ileal Microbiome Association. *Int J Mol Sci.* 24, 3265, doi:10.3390/ijms24043265.

- Kohoutova D., Smajs D., Moravkova P., Cyrany J., Morakova M., Forstlova M., Cihak M., Rejchrt S. & Bures J. 2014. *Escherichia coli* strains of phylogenetic group B2 and D and bacteriocin production are associated with advanced colorectal neoplasia. *BMC Infectious Diseases* 14, 733, doi:10.1186/s12879-014-0733-7.
- Krych L., Hansen C., Hansen A., van den Berg F. & Nielsen D. 2013. Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View toward the Human Gut Microbiome. *PLoS ONE*. 8, 5, doi:10.1371/journal.pone.0062578.
- Lan Y., Jen-Kou L. Lin C., Yang S., Lin C., Wang H., Chen W., Lin T., Jiang J. & Chang S. 2015. Mutations in the RAS and PI3K Pathways are Associated With Metastatic Location in Colorectal Cancers. *J Surg Oncol*. 111: 905–910.
- Lee J-H. & O'Sullivan D. 2010. Genomic Insight into Bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 74: 378–416.
- Li S., Yang S., Zhang Y., Huang K., Liang T., Chen Y., Guan Y., Shang R., Guan T., Wu J., Chen Y. & Guan X. 2022. Amino acid-balanced diets improved DSS-induced colitis by alleviating inflammation and regulating gut microbiota. *European Journal of Nutrition* 61: 3531–3543.
- Liu W., Zhang R., Shu R., Yu J., Li H., Long H., Jin S., Li S., Hu Q., Yao F., Zhou C., Huang Q., Hu X., Chen M., Hu W., Wang Q., Fang S. & Wu Q. 2020. Study of the Relationship between Microbiome and Colorectal Cancer Susceptibility Using 16rRNA Sequencing. *Biomed Res Int*. 2020, 7828392, doi:10.1155/2020/7828392.
- Liu X., Das A., Seideman J., Griswold D., Afuh C., Kobayashi T., Abe S., Fang Q., Hashimoto M., Kin H., Wang X., Shen L., Kawasaki S. & Rennard S. 2007. The CC Chemokine Ligand 2 (CCL2) Mediates Fibroblast Survival through IL-6. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 37: 121–128.
- Lopera-Maya E., Kurilshikov A., Graaf A., Hu S., Andreu-Sánchez S., Chen L., Vila A., Gacesa R., Shina T., Collij V., Klaassen M., Bolte L., Gois M., Neerincx P., Swertz M., Harmsen H., Wijmenga C., Fu J., Weersma R., Zhernakova A. & Sanna S. 2022. Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project. *Nature Genetics* 54: 143–151.
- Louis P. & Flint H. 2008. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett*. 294: 1–8.
- Loupakis F., Yang D., Yau L., Feng S., Gremolini C., Zhang W., Maus M., Antoniotti C., Langer C., Scherer S., Müller T., Hurwitz H., Saltz L., Falcone A. & Lenz H. 2015. Primary Tumor Location as a Prognostic Factor in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 107, dju427, doi:10.1093/jnci/dju427.
- Lyly T., 2011. Suomalainen Syöpäsanasto. <https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopasanasto/> (luettu: 30.9.2020).



- Manfredi S., Lepage C., Hatem C., Coatmeur O., Faivre J. & Bouvier A. 2006. Epidemiology and Management of Liver Metastases from Colorectal Cancer. *Ann Surg.* 244: 229–265.
- Mantovani A., Allavena P., Sica A. & Frances B. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436–444.
- McClellan J., Davis J., Steiner J., Enos R., Jung S., Carson J., Pena M., Carnevale K., Berger F. & Murphy E. 2012. Linking tumor-associated macrophages, inflammation, and intestinal tumorigenesis: role of MCP-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 303: G1087–G1095.
- Menigatti M., Truninger K., Gebbers J., Marbet U., Marra G. & Schär P. 2009. Normal colorectal mucosa exhibits sex- and segment-specific susceptibility to DNA methylation at the *hMLH1* and *MGMT* promoters. *Oncogene* 28: 899–909.
- Miyake T., Mori H., Yasukawa D., Hexun Z., Maehira H., Ueki t., Kojima M., Kaida S., Iida H., Shimizu T., Ohno M., Andoh A. & Tani M. 2021. The Comparison of Fecal Microbiota in Left-Side and Right-Side Human Colorectal Cancer. *Eur Surg Res.* 62: 248–254.
- Montalban-Arques A., Katkeviciute E., Busenhardt P., Bircher A., Wirbel J., Zeller G., Morsy Y., Borsig L., Garzon J., Müller A., Arnold I., Artola-Boran M., Krauthammer M., Sintsova A., Zamboni N., Leventhal G., Berchtold L., de Wouters T., Rogler G., Baebler K., Schwartzfischer M., Hering L., Olivares-Rivas I., Atrott K., Gottier C., Lang S., Boyman O., Fritsch R., Manz M., Spalinger M. & Scharl M. 2021. Commensal *Clostridiales* strains mediate effective anti-cancer immune response against solid tumors. *Cell Host Microbe.* 29: 1573–1588.
- Moore L. & Moore W. 1994. *Oribaculum catoniae* gen. nov., sp. nov.; *Catonella morbi* gen. nov., sp. nov.; *Hallella seregens* gen. nov., sp. nov.; *Johnsonella ignava* gen. nov., sp. nov.; and *Dialister pneumosintes* gen. nov., comb. nov., nom. rev., Anaerobic Gram-Negative Bacilli from the Human Gingival Crevice. *Int J Syst Evol Microbiol.* 44: 187–192.
- Morotomi M., Nagai F. & Watanabe Y. 2012. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62: 144–149.
- Nagasaki T., Hara M., Nakanishi H., Takahashi H., Sato M. & Takeyama H. 2014. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour–stroma interaction. *BJC.* 110: 469–478.
- Nardelli C., Granata I., Nunziato M., Setaro M., carbone F., Zulli C., Pitone V., Capoluongo E., De Palma G., Corcione F., Matarese G., Salvatore F. & Sacchetti L. 2021. 16S rRNA of Mucosal Colon Microbiome and CCL2 Circulating Levels Are Potential Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 4, 22, doi:10.3390/ijms221910747.

- Nishijima S., Suda W., Oshima K., Kim S., Hirose Y., Morita H. & Hattori M. 2016. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res.* 23: 125–133.
- Osman M., Neoh H., Ab Mutalib N., Chin S., Mazlan L., Raja Ali R., Zakaria A., Ngiu C., Ang M. & Jamal R. 2021. *Parvoimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Akkermansia muciniphila* as four-bacteria biomarker panel of colorectal cancer. *Sci Rep.* 11, 1, doi:10.1038/s41598-021-82465-0.
- Pandey H., Tang D., Wong S. & Lal D. 2023. Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Biological Role and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)* 15, 866, doi:10.3390/cancers15030866.
- Park J., Kim N., Yoon H., Shin C., Kim N., Lee D., Park J., Choi C., Kim J., Kim Y., Shin T., Yang J. & Park Y. 2021. Fecal Microbiota and Gut Microbe-Derived Extracellular Vesicles in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 11, 650025, doi:10.3389/fonc.2021.650026.
- Patel M., McSorley S., Park J., Roxburgh C., Edwards J., Horgan P. & McMillan D. 2018. The relationship between right-sided tumour location, tumour microenvironment, systemic inflammation, adjuvant therapy and survival in patients undergoing surgery for colon and rectal cancer. *BJC.* 118: 705–712.
- Pearson-Stuttard J., Zhou B., Kontis V., Bentham J., Gunter M. & Ezzati M. 2018. Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 6: e6–15.
- Pecorino L. 2012. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics.* Oxford University Press, Oxford.
- Pei Z., Bini E., Yang L., Zhou M., Francois F. & Blaser M. 2004. Bacterial biota in the human distal esophagus. *PNAS.* 101: 4250–4255.
- Pekkala S., Keskitalo A., Kettunen E., Lensu S., Nykänen N., Kuopio T., Ritvos O., Hentilä J., Nissinen T. & Hulmi J. 2019. Blocking Activin Receptor Ligands Is Not Sufficient to Rescue Cancer-Associated Gut Microbiota – A Role for Gut Microbial Flagellin in Colorectal Cancer and Cachexia? *Cancer (Basel)* 11, 1799, doi:10.3390/cancers11111799.
- Phipps O., Quraishi M., Dickson E., Steed H., Kumar A., Acheson A., Beggs A., Brookes M. & Al-Hassi H. 2021. Differences in the On- and Off-Tumor Microbiota between Right- and Left-Sided Colorectal Cancer. *Microorganisms* 9, 1108, doi:10.3390/microorganisms9051108.
- Pupo G., Lan R. & Reeves P. 2004. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *PNAS.* 97: 10567–10572.
- Qian L., Gao R., Hong L., Pan C., Li H., Huang J. & Qin H. 2018. Association analysis of dietary habits with gut microbiota of native Chinese community. *Experimental and Therapeutic Medicine* 16: 856–866.

- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Tamada T., Mende D., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S. & Wang J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Rajilić-Stojanović M., Heilig H., Tims S., Zoetendal E. & de Vos W. 2013. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environ Microbiol.* 25: 1146–1159.
- Rhee K., Wu S., Wu X., Huso D., Karim B., Franco A., Rabizadeh S., Golub J., Mathews L., Shin J., Sartor R., Golenbock D., Hamad A., Gan C., Housseau F. & Sears C. 2009. Induction of Persistent Colitis by a Human Commensal, Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in Wild-type C57BL/6 Mice. *Infect Immun.* 77: 1708–1718.
- Rhee S., Im E. & Pothoulakis C. 2008. Toll-Like Receptor 5 Engagement Modulates Tumor Development and Growth in a Mouse Xenograft Model of Human Colon Cancer. *Gastroenterology.* 135: 518–528.
- Rhee S., Im E., Riegler M., Kokkotou E., O'Brien M. & Pothoulakis C. 2005. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *PNAS.* 102: 13610–13615.
- Roca H., Varsos Z., Sud S., Craig M., Ying C. & Pienta K. 2009. CCL2 and Interleukin-6 Promote Survival of Human CD11b+ Peripheral Blood Mononuclear Cells and Induce M2-type Macrophage Polarization. *J Biol Chem.* 284: 34342–34354.
- Rowland I., Gibson G., Heinken A., Scott K., Swann J., Thiele I. & Tuohy K. 2017. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr.* 57, 1, doi:10.1007/s00394-017-1445-8.
- Sanapareddy N., Legge R., Jovov B., McCoy A., Burcal L., Araujo-Perez F., Randall T., Galanko J., Benson A., Sandler R., Abdo Z., Fodor A. & Keku T. 2012. Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J.* 6: 1858–1868.
- Sansonetti P., Phalipon A., Arondel J., Thirumalai K., Banerjee S., Akira S., Takeda K. & Zychilinsky A. 2000. Caspase-1 Activation of IL-1 $\beta$  and IL-18 Are Essential for *Shigella flexneri*-Induced Inflammation. *Immunity* 12: 581–590.
- Schirmer M., Franzosa E., Lloyd-Pricce J., McIver L., Schwager R., Poon T., Ananthakrishnan A., Anderws E., Barron G., Lake K., Prasad M., Sauk J., Stevens B., Wilson R., Braun J., Denson L., Kugathasan S., McGovern D., Vlamakis H., Xavier R. & Huttenhower C. 2018. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nat Microbiol.* 3: 337–346.

- Schoenwolf G., Bleyl S., Brauer P. & Francis-West P. 2015. *Larsen's Human Embryology*. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Sears C., Geis A. & Housseau F. 2014. *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J Clin Invest.* 124: 4166–4172.
- Sender R., Fuchs S. & Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, 8, doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- Senore C., Segnan N. & Gunter M. 2020. *Colorectal cancer Decreasing disparities and promoting prevention are policy priorities*. IRAC World Cancer Report, EN, saatavissa <https://publications.iarc.fr/586>.
- Sfondrini L., Rossini A., Besusso D., Merlo A., Tagliabue E., Mènard S. & Balsari A. Antitumor Activity of the TLR-5 Ligand Flagellin in Mouse Models of Cancer. *J Immunol.* 176: 6624–6630.
- Sheng Q., He K., Li J., Zhong Z., Wang F. & Pan L. 2020. Comparison of Gut Microbiome in Human Colorectal Cancer in Paired Tumor and Adjacent Normal Tissue. *Onco Targets Ther.* 21: 635–646.
- Shivdasani R. 2020. Molecular Biology of Colorectal Cancer. Teoksessa: DeVita T., Lawrence T. & Rosenberg S. (toim.), *Cancer: Principles & Practice of Oncology Primer of the Molecular Biology of Cancer*, Wolters Kluwer, pp. 570–594.
- Silvennoinen O. & Hurme M. 2003. Uutta sytökiineista. *Duodecim* 119: 773–779.
- Soerjomataram I. & Bray F. 2020. *Global trends in cancer incidence and mortality*. IRAC World Cancer Report, EN, saatavissa <https://publications.iarc.fr/586>.
- Stanton T., Duncan S. & Flint H. 2015. *Roseburia*. Teoksessa: Bergey's Manual Trust (toim.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Wiley, doi:10.1002/9781118960608.gbm00652.
- Stephens A. & Cummings J. 1980. The Microbial Contribution to Human Faecal Mass. *J Med Microbiol.* 13: 45–56.
- Stintzing S., Tejpar S., Gibbs P., Thiebach L. & Lenz H. 2017. Understanding the role of primary tumor localization in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer.* 84: 69–80.
- Suga D., Mizutani H., Fukui S., Kobayashi M., Shimada Y., Nakazawa Y., Nishiura Y., Kawasaki Y., Moritani I., Yamanaka Y., Inoue H., Ojima E., Mohri Y., Nakagawa H., Dohi K., Takaba K., Wada H. & Shiraki K. 2022. The gut microbiota composition in patients with right- and left-sided colorectal cancer and after curative colectomy, as analyzed by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *BMC Gastroenterol.* 22, 313, doi:10.1186/s12876-022-02382-y.
- Syöpärekiesteri 2020. Paksusuoli. [https://syoparekiesteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopien-tietolaatikot/12fi\\_Paksusuoli.html#sy%C3%B6p%C3%A4tilastot](https://syoparekiesteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopien-tietolaatikot/12fi_Paksusuoli.html#sy%C3%B6p%C3%A4tilastot) (luettu 20.3.2023).

- Tabung F., Brown L. & Fung T. 2017. Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Review of 17 Years of Evidence (2000–2016). *Curr Colorectal Cancer Rep.* 13: 440–54.
- Takeda K., Kaisho T. & Akira S. 2003. Toll-Like Receptors. *Annu Rev Immunol.* 21: 335–375.
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D., Nalin R., Dore J. & Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* 11: 2574–2584.
- Thomas A., Manghi P., Asnicar F., Pasolli E., Armanini F., Zolfo M., Beghini F., Manara S., Karcher N., Pozzi C., Gandini S., Serrano D., Tarallo S., Francavilla A., Gallo G., Trompetto M., Ferraro G., Mizutani S., Shiroma H., Shiba S., Shibata T., Yachida S., Yamada T., Wirbel J., Schrotz-King P., Ulrich C., Brenner H., Arumugam M., Bork P., Zeller G., Cordero F., Dias-Neto E., Setubal J., Tett A., Pardini B., Rescigno M., Waldron L., Naccarati A. & Segata N. 2019. Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation. *Nature Medicine* 25: 667–678.
- Topping D. & Clifton P. 2001. Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiol Rev.* 81: 1031–1064.
- Tsikitis V., Larson D., Huebner M., Lohse C. & Thompson P. 2014. Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer. *BMC Cancer* 14, 336, doi:10.1186/1471-2407-14-336.
- Turner L., Ping L., Neubauer M. & Berg H. 2016. Visualizing Flagella while Tracking Bacteria. *Biophys J.* 111: 630–639.
- Valdes A., Walter J., Segal E. & Spector T. 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ.* 13, 361, doi:10.1136/bmj.k2179.
- Vogelstein B., Fearson E., Hamilton S., Kern S., Preisinger A., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. & Bos J. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *NEJM.* 9: 525–532.
- Vuik F., Niuwenburg S., Bardou M., Lansdrop-Vogelaar I., Dinis-Ribeiro M., Bento M., Zadnik V., Pellisé M., Esteban L., Kaminski M., Suchanek S., Ngo O., Májek O., Leja M., Kuipers E. & Spaander M. 2019. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut* 68: 1820–1826.
- Wang M., Ahrné S., Jeppson B. & Molin G. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 219–231.
- Wang T., Cai G., Qiu Y., Fei N., Zhang M., Pang X., Jia W., Cai S. & Zhao L. 2012. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 6: 320–329.

- Wang T., Zhang L., Wang P., Liu Y., Wang G., Shan Y., Yi Y., Zhou Y., Liu B., Wang X. & Lü X. 2022. *Lactobacillus coryniformis* MXJ32 administration ameliorates azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colitis-associated colorectal cancer via reshaping intestinal microenvironment and alleviating inflammatory response. *Eur J Nutr.* 61: 85–99.
- Weir T., Manter D., Sheflin A., Barnett B., Heuberger A. & Ryan E. 2013. Stool Microbiome and Metabolome Differences between Colorectal Cancer Patients and Healthy Adult. *PLoS ONE.* 8, 8, doi:10.1371/journal.pone.0070803.
- Wexler H. 2007. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gitty. *Clin Microbiol Rev.* 20: 593–621.
- Wielandt A., Hurtado C., Moreno C M., Villarroel C., Castro M., Estay M., Simian D., Martinez M., Vial M., Kronberg U. & López-Köstner F. 2020. Characterization of Chilean patients with sporadic colorectal cancer according to the three main carcinogenic pathways: Microsatellite instability, CpG island methylator phenotype and Chromosomal instability. *Tumour Biol.* 42, 7, doi:10.1177/1010428320938492.
- Willing B., Dicksved J., Halvarson J., Andersson A., Lucio M., Zheng Z., Järnerot G., Tysk C., Jansson J. & Engstrand L. 2010. A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease Phenotypes. *Gastroenterology* 139: 1844–1854.
- Wirbel J., Pyl P., Kartal E., Zych K., Kashani A., Milanese A., Fleck J., Voigt A., Palleje A., Ponnudurai R., Sunagawa S., Coelho L., Schrotz-King P., Vogtmann E., Habermann N., Niméus E., Thomas A., Manghi P., Gandini S., Serrano D., Mizutani S., Shiroma H., Shiba S., Shibata T., Yachida S., Ulrich C., Brenner H., Arumugam M., Bork P. & Zeller G. 2019. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nature Medicine* 25: 679–689.
- Wong R. 2010. Proximal tumors are associated with greater mortality in colon cancer. *Journal of General Internal Medicine* 25: 1157–1163.
- Wu N., Yang X., Zhang R., Li J., Xiao X., Hu Y., Chen Y., Yang F., Lu N., Wang Z., Luan C., Liu Y., Wang B., Xiang C., Wang Y., Zhao F., Gao G., Wang S., Li L., Zhang H. & Zhu B. 2013. Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. *Microb Ecol.* 66: 462–470.
- Wu S., Rhee K., Albesiano E., Rabizadeh S., Wu X., Yen H., Huso D., Brancari F., Wick E., McAllister F., Housseau F., Pardoll D. & Sears C. 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med.* 15: 1016–1022.
- Wu Y., Jiao N., Zhu R., Zhang Y., Wu D., Wang A., Fang S., Tao L., Li Y., Cheng S., He X., Lan P., Tian C., Liu N. & Zhu L. 2021. Identification of microbial markers across populations in early detection of colorectal cancer. *Nature Communications* 12, 3063, doi:10.1038/s41467-021-23265-y.

- Xiao C., Fedriko V., Beitler J., Bai J., Peng G., Zhou C., Gu J., Zhao H., Lin I., Chico C., Jeon S., Knobf T., Conneely K., Higgins K., Shin D., Saba N., Miller A. & Bruner D. 2021. The role of the gut microbiome in cancer-related fatigue: pilot study on epigenetic mechanisms. *Support Care Cancer*. 29: 3173–3182.
- Xu J., Ye Y., Zhang H., Szmitkowski M., Mäkinen M., Li P., Xia D., Yang J., Wu Y. & Wu H. 2016. Diagnostic and Prognostic Value of Serum Interleukin-6 in Colorectal Cancer. *Medicine* 95, e2502, doi:10.1097/MD.0000000000002502.
- Yaeger R., Chatila W., Lipsyc M., Hechtman J., Cercek A., Sanchez-Vega F., Jayakumaran G., Middha S., Zehir A., Donoghue M., You D., Viale A., Kemeny N., Segal N., Stadler Z., Varghese A., Kundar R., Gao J., Syed A., Hyman D., Vakiani E., Rosen N., Taylor B., Ladanyi M., Berger M., Solit D., Shia J., Saltz L. & Schultz N. 2018. Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Cancer Cell* 33: 125–136.
- Yatsunencko T., Rey F., Manary M., Trehan I., Dominguez-Bello M., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R., Anokhin A., Heath A., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J., Lozupone C., Lauber C., Clemente J., Knights D., Knight R. & Gordon J. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222–227.
- Yazici C., Wolf P., Kim H., Cross T., Vermillion K., Carroll T., Augustus G., Mutlu E., Tussing-Humphreys L., Braunschweig C., Xicola R., Jung B., Llor X., Ellis N. & Gaskins H. 2017. Race-dependent association of sulfidogenic bacteria with colorectal cancer. *Gut*. 66: 1983–1994.
- Yeoh Y., Zuo T., Lui G., Zhang F., Liu Q., Li A., Chung A., Cheung C., Tso E., Fung K., Chan V., Ling L., Joynt G., Hui D., Chow K., Ng S., Li T., Ng R., Yip T., Wong G., Chan F., Wong C., Chan P. & Ng S. 2021. Gut microbiota composition reflects disease severity and sydfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*. 70: 698–706.
- Yu J. Feng Q., Wong S., Zhang D., yi Liang Q., Qin Y., Tang L., Zhao H., Stenvang J., Li Y., Wang X., Xu X., Chen N., Wu W., Al-Aama J., Nilsen H., Kiilerich P., Jensen B., Yau T., Lan Z., Jia H., Li J., Xiao L., Lam T., Ng S., Cheng A., Wong V., Chan F., Xu X., Yang H., Madsen L., Datz C., Tilg H., Wang J., Brünner N., Kristiansen K., Arumugam M., Sung J. & Wang J. 2017. Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut*. 66: 70–78.
- Zeller G., Tap J., Voigt A., Sunagawa S., Kultima J., Costea P., Amiot A., Böhm J., Brunetti F., Habermann N., Hercog R., Koch M., Luciani A., Mende D., Schneider M., Schrotz-King P., Tournigand C., Van Nhieu J., Yamada T., Zimmermann J., Benes V., Kloor M., Ulrich C., von Knebel Doeberitz M., Sobhani I. & Bork P. 2014. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol*. 10, 766, doi:10.15252/msb.20145645.

- Zeller G., Tap J., Voigt A., Sunagawa S., Kultima J., Costea P., Amiot A., Böhm J., Brunetti F., Habermann N., Hercog R., Koch M., Luciani A., Mende D., Scheinder M., Schrotz-King P., Tournigand C., Van Nhieu J., Yamada T., Zimmermann J., Benes V., Kloor M., Ulrich C., von Knebel Doeberitz M., Sobhani I. & Bork P. 2014. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol Syst Biol.* 10, 766, doi:10.15252/msb.20145645.
- Zhang Y., Wang X., Zhou M., Kang C., Lang H., Chen M., Hui S., Wang B. & Mi M. 2018. Crosstalk between gut microbiota and Sirtuin-3 in colonic inflammation and tumorigenesis. *Experimental & Molecular Medicine* 50, 51, doi:10.1038/s12276-017-0002-0.
- Zou Y., Lin X., Xue W., Tuo L., Chen M., Chen X., Sun C., Li F., Liu S., Dai Y., Kristiansen K. & Xiao L. 2021. Characterization and description of *Faecalibacterium butyricigenerans* sp. nov. and *F. longum* sp. nov., isolated from human faeces. *Sci Rep.* 31, 11, doi:10.1038/s41598-021-90786-3.
- Zwinsová B., Petrov V., Hirvňáková M., Smatana S., Micenková L., Kazdová N., Popovici V., Hrstka R., Šerf R., Bencsiková B., Zdražilová-Dubská L., Brychtová V., Nenutil R., Vídeňská P. & Budinská P. 2021. Colorectal tumour mucosa microbiome is enriched in oral pathogens and defines three subtypes that correlate with markers of tumour progression. *Cancers* 13, 4799, doi:10.3390/cancers13194799.
- Zychlinsky A., Prevost M. & Sansonetti P. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167–169.