

# Parkinson Hastalığı Demansı ile Bağırsak Mikrobiyotasındaki *Akkermansia* Genomik Çeşitliliği Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

## Investigation of the Relationship Between *Akkermansia* Genomic Diversity in Gut Microbiota and Parkinson's Disease Dementia

Muzaffer ARIKAN<sup>1,2</sup>(ID), Tuğçe KAHRAMAN DEMİR<sup>3</sup>(ID), Zeynep YILDIZ<sup>4</sup>(ID), Nesrin HELVACI YILMAZ<sup>5</sup>(ID), Aysu ŞEN<sup>6</sup>(ID), Lütfü HANOĞLU<sup>1,5</sup>(ID), Süleyman YILDIRIM<sup>1,7</sup>(ID)

<sup>1</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (SABİTA), İstanbul.

<sup>1</sup> İstanbul Medipol University, Research Institute for Health Science and Technologies (SABITA), İstanbul, Türkiye.

<sup>2</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>2</sup> İstanbul Medipol University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, İstanbul, Türkiye.

<sup>3</sup> Biruni Üniversitesi Meslek Yüksekokulu, Elektronörofizyoloji Bölümü, İstanbul.

<sup>3</sup> Biruni University Vocational School, Department of Electroneurophysiology, İstanbul, Türkiye.

<sup>4</sup> Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi İnsan ve Toplum Bilimleri Fakültesi, Psikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>4</sup> Fatih Sultan Mehmet Vakıf University Faculty of Humanities and Social Sciences, Department of Psychology, İstanbul, Türkiye.

<sup>5</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>5</sup> İstanbul Medipol University Faculty of Medicine, Department of Neurology, İstanbul, Türkiye.

<sup>6</sup> Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul.

<sup>6</sup> Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Research and Training Hospital for Psychiatric and Neurological Diseases, Clinic of Neurology, İstanbul, Türkiye.

<sup>7</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

<sup>7</sup> İstanbul Medipol University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

\*Bu çalışma, TÜBİTAK 1002 programı kapsamında 2205446 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, 20. Ulusal Sinirbilim Kongresi (19-23 Ekim 2022, İstanbul)'nde poster olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Arkan M, Kahraman Demir T, Yıldız Z, Helvacı Yılmaz N, Şen A, Hanoğlu L ve ark. Parkinson hastalığı demansı ile bağırsak mikrobiyotasındaki *Akkermansia* genomik çeşitliliği arasındaki ilişkinin incelenmesi. Mikrobiyol Bul 2024;58(1):13-28.

### ÖZ

Parkinson hastalığında (PH), genellikle sağlıklı ilişkilendirilen bir bakteri cinsi olan *Akkermansia*'nın bağırsak mikrobiyotasında artış gösterdiği bilinse de bu artışın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada Türkiye'deki PH hastalarında, bağırsak mikrobiyotasındaki muhtemel *Akkermansia* değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ilk kez shotgun metagenomik ve *Akkermansia* cinsine özgül bir yeni nesil dizileme (NGS) tekniği kullanılarak PH'de bilişsel bozukluk evreleriyle ilişkili olabilecek belirli *Akkermansia* suşlarının varlığı ve bu suşlarda bulunan potansiyel genler incelenmiştir. Bu kapsamda Türkiye'de toplanmış dört bağırsak mikrobiyotası örneği -üç demanslı PH (PHD) ve bir bilişsel bozukluğu olmayan sağlıklı kontrol (SK)- shotgun metagenomik dizileme yoluyla analiz edilmiş ve örneklerdeki

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Süleyman Yıldırım, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): 444 85 44, E-posta (E-mail): suleymanyildirim@medipol.edu.tr

*Akkermansia* cinsine ait genomlar yeniden inşa edilmiştir. Bu genomlar, veri tabanlarındaki *Akkermansia* cinsine ait genomlarla bir araya getirilerek özel bir veri tabanı oluşturulmuş ve *Akkermansia* cinsine özgül NGS uyumlu primerler bu veri tabanı kullanılarak tasarlanmıştır. Hedef gen bölgesinin çoğaltılması ve cins özgül yeni nesil dizileme için kütüphane hazırlama basamaklarının optimize edilmesinden sonra, 64 PH hastası [32 PHD ve 32 hafif bilişsel bozukluk gösteren PH (PH-MCI)] ile 26 SK'ye ait bağırsak mikrobiyotası örnekleri cins özgül amplicon dizileme ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda, bağırsak mikrobiyotası örneklerinde *Akkermansia muciniphila* türüne ait oldukları belirlenen yedi suşun varlığı tespit edilmiş ve iki suşun demansı (PHD) ve demansı olmayan (PH-MCI, HC) gruplar arasındaki dağılımının anlamlı farklılık gösterdiği ( $p < 0.05$ ) belirlenmiştir. Tespit edilen suşlara ait genomların gen içerikleri, karşılaştırmalı genomik analizler yoluyla incelendiğinde yalnızca dağılımı demanslı ve demansı olmayan gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren iki suşta bulunan 12 genin varlığı tahmin edilmiştir. Bu genlerin anotasyonları yapıldığında ise daha önce rapor edilmemiş ve işlevi bilinmeyen genler oldukları görülmüştür. Bu çalışmada, ilk kez Türkiye'de toplanmış PH hastalarına ait bağırsak mikrobiyotası örneklerinin shotgun metagenomik analizleri gerçekleştirilmiş, özel olarak *Akkermansia* cinsinin analizi için cins-özümlü bir amplicon dizileme yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntem kullanılarak PH'de bilişsel bozukluk evreleriyle ilişkili olabilecek *Akkermansia* suşları ve genleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, tür ya da suş düzeyindeki farklılıkların araştırılmasının, bağırsak mikrobiyotasındaki PH ile ilişkili değişimlerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceğine işaret etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Parkinson; demans; *Akkermansia*; bağırsak mikrobiyotası; cins-özümlü amplicon dizileme; metagenomik.

## ABSTRACT

Although it is known that the relative abundance of *Akkermansia*, a bacterial genus commonly associated with health, increases in the gut microbiota of Parkinson's disease (PD) patients, the exact reason for this increase remains unclear. This study was aimed to identify potential changes in *Akkermansia* within the gut microbiota of PD patients in Türkiye. For this purpose, shotgun metagenomics and a novel *Akkermansia* genus-specific amplicon sequencing technique was used to investigate the presence of specific *Akkermansia* strains associated with cognitive impairment (CI) stages in PD and to examine potential genes within these strains. In this context, four gut microbiota samples from Türkiye -three PD with dementia (PDD) and one healthy control without CI (HC)- were analyzed by shotgun metagenomics and metagenome-assembled genomes assigned to *Akkermansia* genus were reconstructed. Then, a custom database was created by combining these genomes with the *Akkermansia* genomes in public databases and next generation sequencing (NGS) compatible primers specific to the genus *Akkermansia* were designed using this database. After optimization of amplification and library preparation steps for genus-specific next generation sequencing, gut microbiota samples from 64 PD patients [32 PDD and 32 PD with mild CI (PD-MCI)] and 26 HCs were analyzed by genus-specific amplicon sequencing. The results revealed the presence of seven strains assigned to *Akkermansia muciniphila* in gut microbiota samples, two of which showed significant distribution differences ( $p < 0.05$ ) between demented (PDD) and non-demented groups (PD-MCI, HC). When gene contents of the detected *Akkermansia* genomes were examined through comparative genomic analysis, the presence of 12 genes only in *Akkermansia* genomes specific to non-demented groups were predicted. The annotations of these genes showed that they were not reported before with unknown functions. In this study, for the first time, gut microbiota samples from PD patients in Türkiye were analyzed using shotgun metagenomics, a novel genus-specific amplicon sequencing method was developed specifically for the analysis of *Akkermansia* genus, and then *Akkermansia* strains and genes potentially associated with CI stages in PD were identified using this method. The results underscore that investigating the species or strain level differences could help better understanding of the changes associated with PD in the human gut microbiota.

**Keywords:** Parkinson; dementia; *Akkermansia*; gut microbiota; genus-specific amplicon sequencing; metagenomics.

## GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH), tüm dünyada Alzheimer hastalığından sonra en yaygın görülen ikinci nörodejeneratif hastalıktır<sup>1</sup>. Parkinson olgularının önümüzdeki yıllarda artması beklenirken bu hastalık için geliştirilmiş etkili bir tedavi ise henüz bulunmamaktadır<sup>2</sup>. Parkinson hastalarının dörtte biri, tanı konulduğunda bilişsel bozukluğa sahiptir<sup>3</sup> ve PH'de demans prevalansı tanı konulmasından itibaren 12 yıl içinde %80-90 seviyesine çıkmaktadır<sup>4</sup>.

Parkinson hastalarında yaygın olarak bağırsak sağlığı bozuklukları görülmektedir. Buradan hareketle son yıllarda bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin PH ile ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır<sup>5-7</sup>. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar henüz mikrobiyota kompozisyonundaki değişimlerle ilgili bir uzlaşma ortaya koymasa da bazı bulgulara farklı araştırma ekipleri tarafından tutarlı şekilde ulaşılabildiği görülmektedir. Yakın zamanda yayımlanan bir meta-analiz çalışmasında bağırsak mikrobiyota disbiyozu ve PH arasındaki ilişki; ABD, Finlandiya, Rusya, Almanya ve Japonya'da yapılmış beş farklı çalışmadan elde edilen veri setleri kullanılarak incelenmiştir<sup>8</sup>. Bu meta-analiz çalışmasında vücut kitle endeksi, kabızlık, cinsiyet, yaş vb. karıştırıcı faktörlerin etkileri uzaklaştırıldıktan sonra, *Akkermansia* ve *Catabacter* cinsleri ile *Akkermansiaceae* kladının PH hastalarında artış gösterdiği; *Roseburia*, *Faecalibacterium* ve *Lachnospiraceae* ND3007'nin ise PH hastalarında azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada meta-analize katılmayan 12 başka PH-bağırsak mikrobiyotası çalışmasından elde edilen sonuçlar da incelendiğinde de *Akkermansia* cinsinin farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda PH hastalarında sıklıkla artış gösterdiği, *Roseburia* ve *Faecalibacterium* cinslerinin ise azalış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan günümüze kadar yapılan bazı çalışmalarda, *Akkermansia*'nın bağırsak mikrobiyotasının yararlı bir üyesi olabileceği ve sağlıklı bir bağırsak için biyobelirteç olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir<sup>9-12</sup>. Dolayısıyla *Akkermansia*'nın PH hastalarında artış göstermesi, henüz nedeni anlaşılamamış bir olgunun varlığına işaret etmektedir ve literatürde bunun nedenini tam olarak ortaya koyan bir çalışma ise henüz mevcut değildir.

Günümüze kadar yapılan bağırsak mikrobiyotası çalışmalarında çoğunlukla 16S rRNA geni hedefli amplikon dizileme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, genellikle incelenen örneklerdeki bakteriyel komünitenin ancak cins düzeyinde analiz edilebilmesine imkan vermektedir. 16S rRNA amplikon kısa okumaları ile tür ya da suş düzeyindeki analizler ise mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla günümüze kadar yapılan PH-bağırsak mikrobiyotası çalışmalarında, *Akkermansia* cinsinin sağlık/hastalık durumları ile ilişkisi çoğunlukla cins düzeyinde analiz edilmiş ve yorumlanmıştır. Oysaki aynı bakteri cinsine ait farklı türlerin ya da suşların farklı işlevsel özelliklere sahip olabileceği ve sağlık/hastalık durumlarında farklı dağılımlar gösterebileceği de bilinmektedir<sup>13-15</sup>.

Bu çalışmada, Türkiye'deki PH hastalarında bağırsak mikrobiyotasındaki muhtemel *Akkermansia* değişimlerinin saptanması amaçlanmıştır. Bunun için shotgun metagenomik ve *Akkermansia* cinsine özgül bir amplikon dizileme yöntemi kullanılmış ve PH'de bilişsel bozukluk evreleriyle ilişkili belirli *Akkermansia* suşlarının varlığı ve bu suşlarda bu-

lunan muhtemel genler incelenmiştir. Böylece PH’de bilişsel bozukluk evreleri ile bağırsak mikrobiyota kompozisyonundaki *Akkermansia* değişimleri arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamaya katkı sunacak bilgiler edinilmesi hedeflenmiştir.

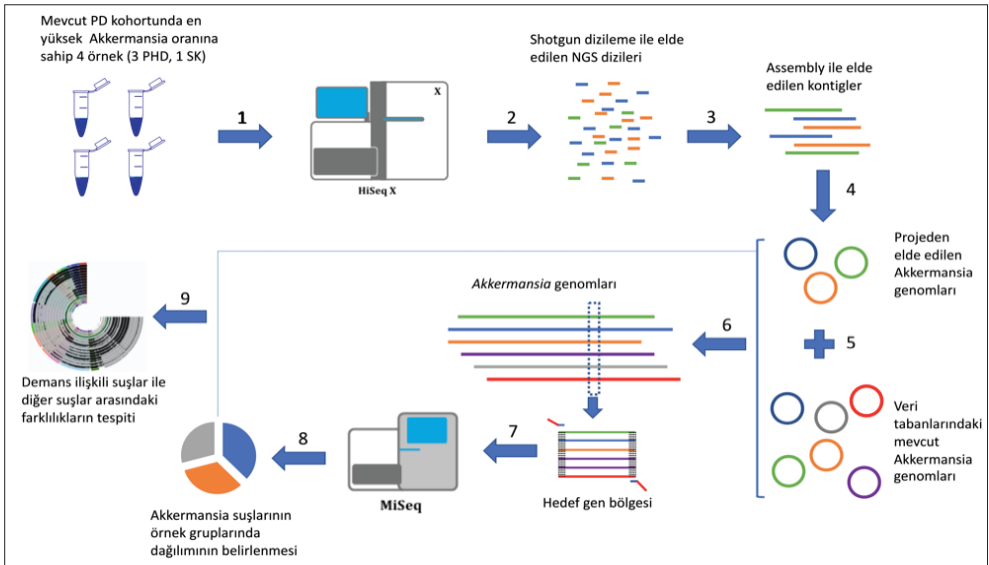
## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 12.11.2020 ve Karar No: 838) ve 2021 yılında İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul şehrinde gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen deneyler ve analizler Şekil 1’de özetlendi. Buna göre öncelikle *Akkermansia* cinsine özgül tür/suş çeşitlilik analizi yapmayı sağlayacak amplicon dizileme temelli yeni bir yöntem geliştirildi. Bu yöntemin geliştirilebilmesi için *Akkermansia* genom seti oluşturulması ve çeşitlilik analizi yapmayı sağlayacak belirteç genlerin belirlenmesi hedeflendi.

### *Akkermansia* Genom Seti Oluşturulması

İnsan bağırsak mikrobiyotasından elde edilen 204938 referans genomu içeren kapsamlı bir katalog olan the “Unified Human Gastrointestinal Genome (UHGG)” koleksiyonundan<sup>16</sup> *Akkermansia* genomları için oluşturulmuş 11 tür düzeyinde temsili genom indirildi. Ek olarak, NCBI veri tabanından *Akkermansia* cinsine ait mevcut tüm genomlar (25 Mayıs 2022) indirilerek oluşturulan genom setine eklendi.

Halihazırda mevcut veri tabanlarında ve referans genom kataloglarında Türkiye’den alınmış bir insan bağırsak metagenom örneği bulunmaması nedeniyle, Türkiye’deki bir PH kohortunda, görece en yüksek *Akkermansia* oranına sahip oldukları 16S rRNA geni amplicon dizileme ile tespit edilen dört dışkı örneğinden (üç PHD ve bir SK) *Akkermansia*



Şekil 1. Çalışmanın genel iş akışı.

genomları elde edildi<sup>17,18</sup>. Böylelikle daha önce rapor edilmemiş ancak Türkiye’de mevcut olabilecek *Akkermansia* genomlarının da hedeflenebilmesi sağlandı. SK, PH-MCI ve PHD gruplarını içeren bu kohorta en yüksek *Akkermansia* oranına sahip bu dört örneğin seçilmesi yoluyla, *Akkermansia* cinsine ait tüm genomların yeterli derinlikte (coverage) elde edilebilmesi hedeflendi. PH-MCI grubunda ise yapılacak dizilemelerle yeterli derinlikte *Akkermansia* tüm genom elde edilmesine imkan verecek bir örnek bulunmadığı için bu gruptan örnek seçilmedi.

Belirlenen dört örnek shotgun metagenomik yöntemiyle dizilendi. Örneklerden *Akkermansia* genomlarının elde edilmesi için şu biyoinformatik analiz basamakları izlendi: Shotgun metagenomik dizilemeden sonra ham dizilerdeki adaptörlerin kaldırılması ve düşük kaliteli dizilerin filtrelenmesi Trimmomatic programı ile yapıldı<sup>19</sup>. Daha sonra metaSPAdes<sup>20</sup> programı kullanılarak *de novo* assembly analizi (DNA dizilerinin birleştirilmesiyle ‘kontig’ adı verilen daha uzun dizilerin oluşturulması) gerçekleştirildi. MetaBat2 programı ile yapılan “binning (kümeleme)” analizi sonucunda, aynı genomdan geldikleri tahmin edilen kontigleri içeren ve “bin” adı verilen kontig kümeleri oluşturuldu<sup>21</sup>. Binlerin tamlık ve kontaminasyon oranları ise CheckM programı ile belirlendi<sup>22</sup>. Yüksek kaliteli *Akkermansia* binleri (> %90 tamlık, < %5 kontaminasyon) belirlenerek *Akkermansia* genom seti oluşturulması için kullanıldı.

### ***Akkermansia* Cinsine Özgül NGS Amplikon Dizileme Temelli Bir Yöntem Geliştirilmesi**

Oluşturulan *Akkermansia* referans genom seti temel alınarak bütün genomlarda ortak olan ve aynı zamanda suşlar arasında en yüksek ayrıma imkan veren gen bölgelerini hedefleyen *Akkermansia* cinsine özgül primer setleri manuel olarak tasarlandı. *Akkermansia* genomlarının sıralanması ve uygun olabilecek gen bölgelerin tespiti Clustal Omega programı kullanılarak gerçekleştirildi<sup>23</sup>. Korunmuş gen bölgelerini hedefleyen dejenere primerler tasarlandı ve Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) programı ile *Akkermansia*’ya özgül olup olmadıkları test edildi. Daha sonra aday primer çiftleri in silico polimeraz zincir reaksiyonu [polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)] analizleriyle test edildi. Buna göre öncelikle primer çiftlerinin hedeflediği gen bölgeleri Cutadapt programı kullanılarak hedef tüm gen dizilerinden ayrıldı ve böylece yapay amplikon setleri oluşturuldu<sup>24</sup>.

Bu amplikon setini oluşturan dizilerin birbiriyle benzerliği ise dRep programı kullanılarak belirlendi<sup>25</sup>. Yapılan benzerlik analizi sonucunda oluşan amplikon kümesi sayısı sayesinde primerlerin ayırt ediciliği incelendi.

Tasarlanan primerler arasından en iyi amplifikasyon ve ayırt ediciliğe sahip olanlara Illumina MiSeq platformuna ait adaptör dizileri (ileri adaptör dizisi: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-3'; geri adaptör dizisi: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-3') eklendi ve amplifikasyon verimlilikleri test edildi. Analizler sonucunda NGS platformlarına kullanıma en uygun primer çifti olarak 50S riboso-

mal protein L3 (rplC) genini hedefleyen primer çifti (ileri primer rplcF: 5'-GGC ATY CAG CCY ACC AAR CT-3; geri primer rplcR: 5'-RAT CAC GAG GTA SGA ACC GC-3') seçildi. Daha sonra bu primerler kullanılarak NGS kütüphane hazırlıkları tamamlandı. İndeks PCR aşamasında ise halihazırda Illumina tarafından sağlanan Nextera XT indeks kiti kullanıldı.

### Bağırsak Mikrobiyotasındaki *Akkermansia* suşları ile PHD Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Geliştirilen *Akkermansia* cinsine özgül NGS ampikon dizileme temelli yöntem kullanılarak 26 SK, 32 PH-MCI ve 32 PHD örneği analiz edildi. Katılımcıların yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi gibi klinik ve demografik bilgileri klinik ziyaretleri sırasında toplandı (Tablo I). Hastalar deneyimli nörologlar tarafından muayene edildi ve Parkinson hastalığı tanısı, Birleşik Krallık Parkinson Hastalığı Derneği Beyin Bankası kriterleri doğrultusunda konuldu. Önceden kafa travması geçirmiş, felç geçirmiş veya toksik maddelere maruz kalmış, madde bağımlılığı geçirmiş, son bir ay içinde antibiyotik veya probiyotik kullanmış, kronik ciddi hastalıkları olan (örn., diyabet, kanser, böbrek yetmezliği vb.), otoimmün hastalıkları olan veya sigara içen kişiler çalışma dışı bırakıldı. Bu dışlama kriterlerine göre çalışmanın gerçekleştirildiği zaman diliminde, muayene edilen toplam 348 PD hastası içinden 114 hasta PH-MCI ya da PHD tanısıyla detaylı bilgi ve nöropsikometrik testler için yönlendirildi. Bu hastalardan 13'ü bilişsel bozukluğu olmaması, biri mental retardasyon, beşi Lewy cisimcikli demans, biri polip, üçü beyin pili, biri esansiyel tremor nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Hastalığın evresini belirlemek için Hoehn-Yahr Parkinson evreleme ölçeği kullanılırken demans değerlendirmesinde The Movement Disorder Society, Parkinson hastalığı demans tanı kriterleri uygulandı<sup>26</sup>. MCI tanısı ise Litvan ve arkadaşları<sup>27</sup> tarafından tanımlanan kriterlere göre konuldu.

Bu örneklerle ait genomik DNA'lardaki hedef gen bölgeleri, geliştirilen *Akkermansia* özgül primerleriyle çoğaltıldı ve kütüphane hazırlandı. Daha sonra Illumina MiSeq plat-

**Tablo I.** Katılımcıların Demografik ve Klinik Özellikleri

	SK (s= 26)	PH-MCI (s= 32)	PHD (s= 32)
Yaş (Yıl, Ortalama ± SS)	59.6 ± 8.2	66.2 ± 9.9*	73.8 ± 7.0*#
Cinsiyet (Kadın)	14 (53.8%)	17 (53.1%)	20 (62.5%)
Eğitim (Yıl, Ortalama ± SS)	10.2 ± 5.6	7.5 ± 4.9*	4.8 ± 4.3*
MMSE (Ortalama ± SS)	27.6 ± 1.8	23.2 ± 3.1*	18.5 ± 3.8*#
CDR (Ortalama ± SS)	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0*	1.2 ± 0.4*#
Hoehn-Yahr Skoru (Ortalama ± SS)	-	1.9 ± 0.7	2.8 ± 1.1#
BPHDÖ-Bölüm II (Ortalama±SS)	-	32.1 ± 14.5	50.7 ± 17.2#

PH: Parkinson hastalığı, SD: Standart sapma; MMSE: Mini-mental state testi, SK: Sağlıklı kontrol, PH-MCI: Hafif bilişsel bozukluk gösteren Parkinson hastası, PHD: Demanslı Parkinson hastası.  
\*p< 0.05 SK ile yapılan ikili karşılaştırmalar.  
#p< 0.05 PH-MCI ile yapılan ikili karşılaştırmalar.

formunda 2 x 250 baz çifti dizileme kiti kullanılarak dizileme gerçekleştirildi. Elde edilen ampikon dizilerinin analizinde Metaxa2 programı ve *Akkermansia* genom setinden hedef gen bölgesine ait dizilerin ayrılması ile oluşturulmuş özel dizi veri tabanı kullanıldı<sup>28</sup>.

Taranan örnek grupları arasında dağılımı farklılık gösteren suşların tüm genom düzeyinde işlevsel özellikleri belirlendi. Gen tahminleri Prokka programı, çekirdek genom analizleri ise Roary programı kullanılarak gerçekleştirildi<sup>29,30</sup>. Tespit edilen *Akkermansia* genomlarının daha önce rapor edilmiş *Akkermansia* genomları ile ilişkisi de dRep programı kullanılarak belirlendi.

## BULGULAR

Shotgun metagenomik dizileme gerçekleştirilen dört örneğe ait dizileme sonuçları NCBI SRA veri tabanına yüklenmiştir (Accession ID: PRJNA838759). Dizileme sonucu elde edilen verilere ait genel bilgiler Tablo II’de gösterilmiştir.

Dizilemeler sonucunda örnek başına ortalama yaklaşık 82 milyon DNA dizisi elde edilmiştir. Kalite kontrol analizleri sonucunda dizilerin ortalama yaklaşık %8’i filtrelenmiştir. Daha sonra dizilerin ortalama %9’unun insan genomuna ait olduğu tespit edilmiş ve metagenomik analizlerden önce filtrelenmiştir. Kalite kontrol ve filtreleme aşamaları tamamlandıktan sonra, örnek başına ortalama 73 milyon DNA dizisi metagenomik analizlerde kullanılmıştır.

Dizilenen dört shotgun metagenomik örneğinin içerdiği *Akkermansia* genomları biyoinformatik yöntemlerle yeniden inşa edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda üç yüksek kaliteli *Akkermansia* genomu inşa edilmiştir. Bu genomlara ek olarak, NCBI veri tabanından *Akkermansia* cinsine ait 258 genom dizisi ve Almeida ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>16</sup> elde edilen 11 tür düzeyinde temsili *Akkermansia* genomu da indirilmiştir. Böylece 272 *Akkermansia* genomu içeren bir genom seti oluşturulmuştur.

Oluşturulan *Akkermansia* genom setinde çekirdek gen analizleri gerçekleştirilerek primer tasarımına uygun aday genler tespit edilmiştir (Tablo III). *Akkermansia* genom setindeki bütün genomlarda bulunduğu tespit edilen 155 çekirdek gen içinden 10 aday gen belirlenerek primer tasarımı için kullanılmıştır. Aday genlerin belirlenmesinde gen dizilerinin ayırt ediciliği ve NGS sistemlerine uygunlukları dikkate alınmıştır.

**Tablo II.** Shotgun Metagenomik Dizileme ile Elde Edilen Dizilerin Genel Özellikleri

Örnek	*R1	*R2	*R3	*R4
1	96879193	89512304	89493761	0.95
2	76005088	69841636	69827968	0.94
3	76505198	71024714	70854837	0.95
4	77869903	71852083	61393845	0.81

\*R1: Ham dizi sayısı, \*R2: Kalite kontrol sonrası kalan dizi sayısı, \*R3: İnsan genomuna ait diziler filtrelendikten sonra kalan dizi sayısı, \*R4: Mikrobiyal dizi sayısının toplam dizi sayısına oranı.



**Tablo III.** *Akkermansia Referans Genom Seti için Çekirdek Gen Analizi Sonuçları*

Gen Türü	Genom Setinde Bulunma Yüzdeleri	Gen Sayısı
Çekirdek Gen	%99-100	155
Soft Çekirdek Gen	%95-99	87
Shell Gen	%15-95	4636
Cloud Gen	%0-15	13422
Toplam Gen Sayısı	%0-100	18300

Aday genleri hedefleyen primerlerin oluşturduğu amplikonların farklı *Akkermansia* suşlarını ne ölçüde ayırt ettiği in silico PCR ve amplikon kümeleme analizleriyle belirlenmiştir. Buna göre yapılan analizlerde, amplikonlar arasında en yüksek %99 benzerlik ölçütü kullanılarak minimum 32, maksimum 58 farklı amplikon kümesi oluşturulabildiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla en yüksek sayıda farklı amplikon kümesi oluşturan ilk 10 primer çiftinin (Tablo IV) laboratuvar ortamında amplifikasyon verimliliklerinin test edilmesine karar verilmiştir.

Primer çiftlerinin denenmesi için Tablo V ve Tablo VI'da belirtilen PCR koşulları uygulanmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda 50S ribosomal protein L3 (*rpL3*) genini hedefleyen *Akkermansia* cinsine özgül bir primer çifti ile NGS kütüphanesi hazırlanmasına karar verilmiştir. NGS kütüphane hazırlık aşaması 16s rRNA amplikon dizilemesi için uygulanan standart protokoller izlenerek hazırlanmıştır.

Yapılan analizlerde dizilenen 90 örnekten (26 SK, 32 PH-MCI ve 32 PHD) 66 tanesinde *Akkermansia* varlığı tespit edilmiştir. *Akkermansia* tespit edilen örneklerden 19'unun SK, 21'inin PH-MCI ve 26'sının PHD grubuna ait olduğu belirlenmiştir. *Akkermansia* varlığı tespit edilen örnekler üzerinden yapılan analizlerde örneklerde toplam yedi farklı *Akkermansia* suşunun varlığı belirlenmiştir. Bu suşlara ait genomlar, tür düzeyinde temsili *Akkermansia* genomlarıyla karşılaştırıldığında, bu suşların yeni *Akkermansia* türleri olmadıkları ve *Akkermansia muciniphila* türüne ait oldukları belirlenmiştir (Şekil 2).

Suş2, Suş3, Suş4, Suş7, Suş17, Suş40 ve Suş55 olarak adlandırılan bu suşların gruplar arasında dağılım farklılıkları gösterdikleri de belirlenmiştir (Şekil 3). Suş4 demansı olmayan gruplarda sekiz kişide tespit edilirken (%20), PHD grubunda tespit edilmemiştir. Suş17 ise demansı olmayan gruplarda yedi kişide tespit edilirken (%17,5), PHD grubunda tespit edilmemiştir. Dolayısıyla Suş4 ve Suş17 dağılımının PHD grubu ile demansı olmayan gruplar arasında (SK ve PH-MCI) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği (Fisher's exact testi, Suş4 için  $p=0.019$ , Suş17 için  $p=0.038$ ) bulunmuştur. Yapılan istatistiksel testler için güç analizi yapıldığında %95 güven aralığı ve %5 hata payı ile Suş4 için %84 güç elde edilirken, Suş17 için %75 güç elde edildiği görülmüştür.



Tablo IV. *Akkermansia Cinsine Özgü NGS Uyumlu 10 Primer Çiftinin Özellikleri*

Gen	Forward Primer	Revers Primer	Forward Primer Tm	Revers Primer Tm	Amplikon Uzunluğu (Baz Çifti)
<i>aspT</i>	CGC TCT TYG TDT ACT GCG TG	CAG CAT CAT YTC MCG CYT	59.84	57.75	384
<i>elf4</i>	CCA GAC RCT BGC CAA CAT GC	TAC ACT TCR TCC GTD GCR AA	60.04	59.97	366
<i>glgP</i>	CMG GCA AVG AAA AGA TGG AY	CCA TAC GAT GGT GAG GCA G	59.83	57.7	401
<i>infB</i>	ACM TTC GCC CGT GAA AAA CG	CCT TGG ART GGG CGA TGG	60.04	60.12	409
<i>recA</i>	TTC ATY GAC GTG GAA CAC GC	TTC CGG ATT GCC GAA CAT GA	59.42	60.04	358
<i>rplC</i>	GGC ATY CAG CCY ACC AAR CT	RAT CAC GAG GTA SGA ACC GC	60.03	59.82	396
<i>rpoA</i>	CTT GAA GTM TGG ACG GAC GG	GAR AGV CCC AGT TCC AGC A	60.39	60.23	353
<i>rpoD</i>	GTY TCC CTG CTY ACC CGT GA	GGG CYT CGT CAA TCA YGG AA	59.96	60.11	418
<i>rpsB</i>	CCA ACA TGA GCA CNA TCC GC	CCT TCG TTG ATG GCC TTG AC	60.18	59.2	367
<i>thrS</i>	CCA TGC TCC AGC GCA TYT AC	SRC WSA GTT TTT CCA TGG CG	59.97	60.11	360

Tespit edilen yedi suşu temsil eden genomlar kullanılarak gerçekleştirilen çekirdek gen analizleri sonucunda, dağılımları anlamlı farklılık gösteren Suş4 ve Suş17'yi temsil eden genomlarda ortak olarak bulunan ancak diğer suşları temsil eden genomlarda bulunmayan 12 gen tespit edilmiştir. Bu genlerin anotasyonları yapıldığında ise daha önce rapor edilmemiş ve işlevi bilinmeyen genler oldukları görülmüştür.

**Tablo V.** Primerler için PCR Koşulları

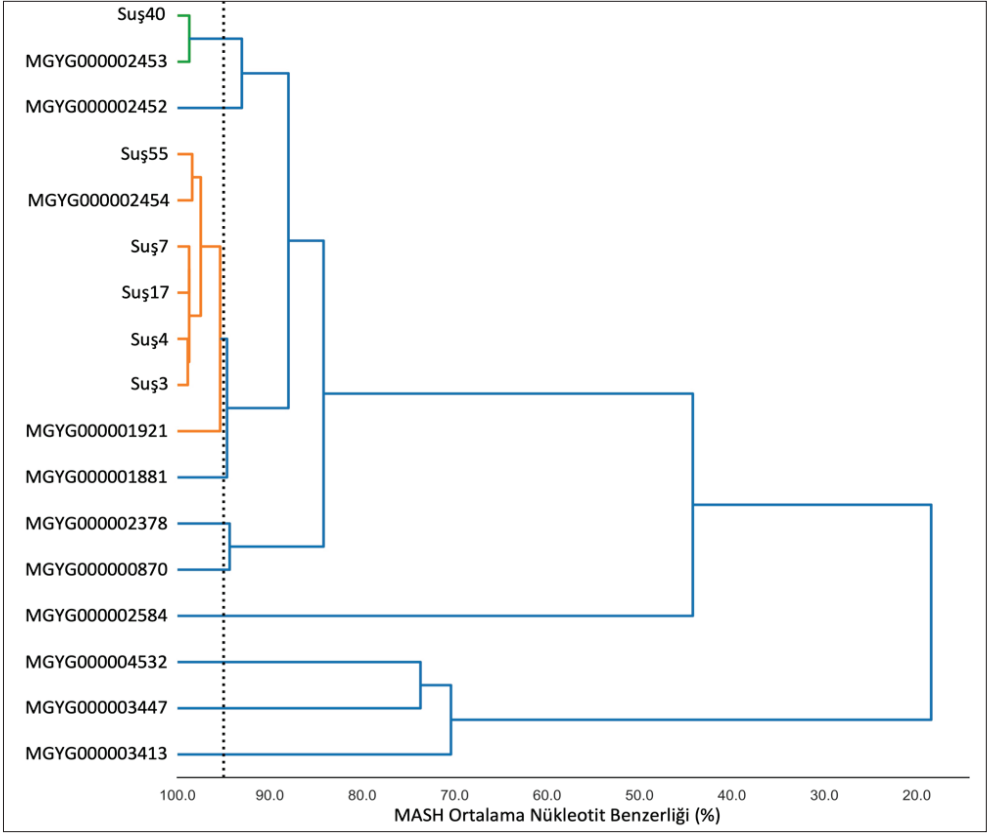
Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	180	1
Denatürasyon	95	30	25
Yapışma	56	30	
Uzama	72	30	
Son Uzama	72	300	1

**Tablo VI.** PCR Karışımı

İçerik	Konsantrasyon	Miktar (µl)
Mikrobiyal DNA	5 ng/µl	2
Forward Primer	10 µM	0.5
Revers Primer	10 µM	0.5
dNTP	10 mM	0.5
10X Reaksiyon Tampon Çözeltisi	-	5
KAPA HiFi 'HotStart Polymerase'	1 u/µl	0.5
Nükleaz İçermeyen dH <sub>2</sub> O	-	16
<b>Toplam Hacim</b>		<b>25</b>

## TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan pek çok çalışma, *Akkermansia*'nın bağırsak mikrobiyotasının yararlı bir üyesi olduğunu ve sağlıklı bir bağırsak için biyobelirteç olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir<sup>12</sup>. Ancak diğer taraftan *Akkermansia*, görece bolluk artışı PH ile en sık ve tutarlı şekilde ilişkilendirilmiş bağırsak mikrobiyotası üyesi olarak öne çıkmaktadır. Çelişkili gibi görünen bu durum, *Akkermansia* ve PH ilişkisinde nedeni henüz anlayamamış bir olgunun varlığına işaret etmektedir. Günümüze kadar yapılan bağırsak mikrobiyotası çalışmaları incelendiğinde, çoğunlukla cins ya da tür düzeyinde ilişkilendirmelere dayandıkları görülmektedir. Dolayısıyla suş düzeyindeki muhtemel geniş çeşitlilik göz ardı edilmektedir. Örn., yakın zamanda yapılan bir çalışmada insan bağırsak mikrobiyotasının bir diğer üyesi olan *Prevotella* cinsinin sağlık ve hastalık durumları ile ilişkisi üzerine daha önce elde edilmiş çelişkili sonuçların, aralarında önemli genetik ve işlevsel farklılıklar bulunan *Prevotella* suşlarının varlığından kaynaklandığı tespit edilmiştir<sup>16</sup>. Bu durum, başka bağırsak mikrobiyotası üyeleri için elde edilen çelişkili gibi görünen bazı bulguların da gözden kaçırılan suş düzeyindeki farklılıklardan kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Literatürde *Akkermansia* cinsi ile PH demansı arasındaki ilişkiyi suş düzeyinde inceleyen bir çalışma ise mevcut değildir. Belirtilen noktalardan ve literatürdeki boşluktan hareketle bu çalışmada, *Akkermansia* cinsi ile PH'de demans gelişimi arasındaki ilişki cins yerine suş düzeyinde incelenmiştir. Bunun için *Akkermansia* cinsine özgül NGS temelli yeni bir amplikon dizileme yöntemi geliştirilmiştir.



Şekil 2. Kohort gruplarında tespit edilen Akkermansia suşlarının daha önce rapor edilmiş tür düzeyinde temsili Akkermansia genomları ile kümelendirme, %95 ANI [Average Nucleotide Identity (Ortalama Nükleotit Benzerliği)] sonuçları.



Şekil 3. Kohort gruplarında tespit edilen Akkermansia suşlarının dağılımı.

Bu yöntemin geliştirilmesi için öncelikle bir *Akkermansia* genom seti oluşturulmuştur. Bağırsak mikrobiyotası üyelerinin suş çeşitliliğinin coğrafyaya bağlı olarak da değişkenlik gösterebildiği daha önce rapor edilmiştir<sup>31</sup>. Bu nedenle, mevcut veri tabanlarındaki *Akkermansia* genomlarına ek olarak Türkiye’de toplanmış bağırsak mikrobiyotası örneklerinden elde edilen *Akkermansia* genomları da kullanılmıştır. Ancak bu genomlar daha önce bildirilmiş *Akkermansia* genomları ile karşılaştırıldıklarında yeni türler olmadıkları belirlenmiştir. Oluşturulan *Akkermansia* genom setinden hedef belirteç gen bölgeleri tespit edilmiş ve *Akkermansia* cinsine özgül bir amplikon dizileme yöntemi geliştirilmiştir. Daha sonra bu yöntem kullanılarak SK, PH-MCI ve PHD gruplarından toplanmış bağırsak mikrobiyotası örneklerinde farklı *Akkermansia* suşlarının varlığı ve dağılımı incelenmiştir. Çalışma sonucunda, üç kohort grubunda da *Akkermansia* varlığı tespit edilmiş ve kohortlar arasında dağılım gösteren yedi *Akkermansia* suşunun varlığı belirlenmiştir. SK grubunun önemli bir kısmında da *Akkermansia* bulunması günümüze kadar yapılan çalışmalarda dikkate alındığında beklenen bir sonuçtur. Bunun yanında *Akkermansia* içindeki bazı suşların yalnızca demans olmayan gruplarda saptanması, çalışma hipotezinde belirtilen türlerin/suşların hastalık durumunda farklılaşan değişim profilleri göstermesi önerisini desteklemektedir. Ancak bu değişimlerin PH gelişimine etki edip etmediğinin saptanması için kapsamlı, uzun süreli kohort araştırmalarına gereksinim artmaktadır. *Akkermansia muciniphila* türüne ait oldukları belirlenen bu suşlardan iki tanesinin ise sadece SK ve PH-MCI gruplarında bulunduğu tespit edilmiştir. Dağılımları PHD ve diğer iki grup arasında anlamlı farklılık gösteren bu iki suşun genomları diğer suşlarla karşılaştırıldığında ise 12 genin diğer genomlardan farklı olarak sadece bu iki suşa ait genomlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genlerin anotasyonları yapıldığında ise daha önce rapor edilmemiş ve işlevsel özellikleri bilinmeyen genler oldukları görülmüştür.

Son yıllarda *Akkermansia* cinsi içindeki çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiş araştırmalar da mevcuttur: Guo ve arkadaşları<sup>32</sup>, yetişkin insanlardan elde edilen 33 ve laboratuvar farelerinden elde edilen altı yeni izolatan pangenomik analizini yaparak *Akkermansia* cinsinin popülasyon yapısı ve evrimsel özellikleri hakkında önemli bilgiler elde etmiştir. Bu çalışmada, bağımsız olarak evrimleşmekte olan tür seviyesinde en az üç filogrubun (Aml, AmlI ve AmlII) varlığı gösterilmiştir. Kırmızı ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada<sup>33</sup> ise 2-9 yaş arası çocuklardan 35 *Akkermansia* genomu ve Guo ve arkadaşlarının çalışmasındaki<sup>32</sup> genomlar incelenerek *Akkermansia* filogrupları arasında çeşitlilik ve bu çeşitliliğin yol açtığı muhtemel fonksiyonel farklılıklar belirlenmiştir. Karcher ve arkadaşları tarafından yapılan yakın zamanlı bir çalışmada<sup>34</sup> ise 18600 metagenomik örnekten elde edilen 2420 *Akkermansia* genomu analiz edilmiş ve insan bağırsağında *Akkermansia muciniphila* dışında dört adet aday tür bulunduğu rapor edilmiştir. Diğer taraftan mevcut çalışmada ise Almeida ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>16</sup> oluşturulan 11 tür düzeyinde temsili *Akkermansia* genomu karşılaştırmalar için kullanılmıştır. Yapılan bu iki kapsamlı çalışmada farklı sayıda aday *Akkermansia* türü tespit edilmesinin yöntemsel farklılıklara dayandığı görülmektedir. Karcher ve arkadaşları belirledikleri aday türlerin,

16S rRNA geninde çok yüksek benzerliğe sahip olsalar da tüm genom düzeyinde farklılıklar gösterdiklerini, bu durumun da *Akkermansia*'nın çeşitliliğinin 16S rRNA gen dizilimine dayalı önceki çalışmalarda gözden kaçmış olabileceğini açıklayabileceğini belirtmektedir. Dolayısıyla bu bulgu, çalışma kapsamında öne sürülen gözden kaçan *Akkermansia* çeşitliliği olduğu savını desteklemektedir. Aynı çalışmada ayrıca diğer türlerle karşılaştırıldığında *Akkermansia muciniphila* türünde B12 vitamini sentez yeteneğinin yokluğuna işaret eden gen kayıpları da bildirilmiştir. Ancak çalışmamızda yalnızca *Akkermansia muciniphila* türüne ait olan genomlar tespit edildiği için bu sentez yoluğ üzerinden de bir fark gözlenmemiştir.

*Akkermansia* ile PH arasındaki ilişki üzerine son dönemlerde önemli çalışmalar yapılmış ve PH'de bu cinsin artışının muhtemel nedenleri üzerine önemli sonuçlar elde edilmiştir: Hertel ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada<sup>35</sup>, 30 ilaç naif PH hastası, 30 de novo PH hastası ve 30 sağlıklı kontrole ait boylamsal mikrobiyotası ve metabolom verileri karşılaştırılmıştır. Yapılan analizlerde PH hastalarında transsülfürasyon yoluğının etkilendiği ve *Akkermansia muciniphila*'nın PH patolojisine özellikle H2S üretimi yoluyla katkıda bulunuyor olabileceği rapor edilmiştir. Bu çalışma kapsamında özellikle sülfür metabolizmasında rol oynayan genler bakımından suşlar arasında bir farklılık olup olmadığı analiz edilmiş ancak bir fark tespit edilememiştir.

Bağırsaktaki *Akkermansia* görece bolluk artışının PH hastalığının ilerleyişini tahmin etme ve izlemede kullanılabileceğine dair de yakın zamanlı çalışmalar yayımlanmıştır. Örneğin Nishiwaki ve arkadaşları<sup>36</sup>, kısa zincirli yağ asidi üreten *Fusicatenibacter*, *Faecalibacterium* ve *Blautia* cinslerindeki görece bolluk azalışı ile müsün degrade eden *Akkermansia* cinsindeki görece bolluk artışının hızlanan PH ilerleyişini tahmin edebildiğini rapor etmiştir. Ancak yapılan çalışma amplikon dizileme temelli olduğu için analizler ancak cins seviyesinde yapılabilmektedir. Dolayısıyla tür ya da suş düzeyinde bir ayrışma olup olmadığı konusunda herhangi bir çıkarım yapmak mümkün değildir.

*Akkermansia*'nın müsün degradasyon özelliği üzerinden PH ile ilişkili olabileceği de bir diğer muhtemel senaryo olarak araştırılmaktadır. Pedro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada<sup>37</sup>, *Akkermansia muciniphila*'nın in vitro koşullarda enteroendokrin hücrelerde anormal alfa-sinüklein birikimine neden olduğu gösterilmiş ve bu etkinin ilgili suşun müsün degradasyon yeteneğinden etkilendiği belirtilmiştir. Yakın tarihli bir başka çalışmada ise *Akkermansia muciniphila*'nın intestinal bariyerin regülasyonunda suş-özgül yüzey proteinlerinin belirleyici olduğu belirlenmiştir<sup>38</sup>. Dolayısıyla *Akkermansia muciniphila* suşlarının farklı işlevsel genlerin varlığı ya da etkinliği bakımından karşılaştırılması ve PH ilerleyişindeki farklılıklarının tespiti gelecekteki çalışmalar için önemli bir araştırma alanı olarak görünmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, belirli *Akkermansia* suşlarının PHD grubunda bulunmadığını göstermekle beraber, bu değişimin PH gelişimine etki edip-etmediğinin saptanması için kapsamlı, uzun süreli kohort araştırmalarına gereksinim artmaktadır. Çalışma

kapsamında tespit edilen genlerin işlevsel özelliklerinin yeni araştırma çalışmalarıyla tespit edilmesinin de *Akkermansia* ile PH'de demans gelişimi arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesine zemin hazırlayacağı düşünülmektedir. Belirlenen suşların işlevsel özellikleri daha iyi anlaşıldığında demans gelişiminin önlenmesi ya da yavaşlatılmasında önemli olabilecek muhtemel rolleri ortaya konulabilecektir. Böylece bu suşlara dayalı yeni tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi de mümkün olacaktır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda daha büyük kohortlarda, konak popülasyon farklılıkları ve diğer yönleri de dikkate alınarak, boylamsal örneklerle çalışılması bu cinsin hastalık ve sağlıkta oynadığı rollerin daha doğru belirlenebilmesini sağlayacaktır.

Bu çalışmanın temel sınırlılıkları şu şekilde sıralanabilir: i) Çalışma kapsamında uygulanan yöntemlerle elde edilen sonuçlar ilişkiselliği göstermekle birlikte nedensellik konusunda herhangi bir çıkarıma imkan vermemektedir. ii) Çalışmanın örneklem büyüklüğü *Akkermansia* çeşitliliğini ancak belirli bir ölçüde yansıtabilmektedir. iii) Çalışmada analizler, mevcut veri tabanlarından elde edilen *Akkermansia* genom setine Türkiye'deki üç PH hastası ve bir SK'den elde edilen *Akkermansia* genomları eklenerek gerçekleştirilmiştir. Ancak PH hastaları ile SK bağırsak mikrobiyotasından elde edilen *Akkermansia* suşları arasında genomik düzeyde bir karşılaştırma yapılabilmesi için belli insan topluluklarından çok daha geniş genom setlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu tür kapsamlı analizlerin *Akkermansia*-PH ilişkisinin doğru anlaşılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. iv) Amplikon dizileme temelli yöntemsel yaklaşımda primer seçimine bağlı sapmaların olması muhtemeldir. v) Gen içerik tahminleri ve belirli genlerin varlığı, bu genlerin ifade sine dair bilgi vermemektedir.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 12.11.2020 ve Karar No: 838).

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 220S446 numaralı 1002 projesi ile desteklenmiştir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 386(9995): 743-800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)
2. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kiebertz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 2007; 68(5): 384-6. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>
3. Aarsland D, Creese B, Politis M, Chaudhuri KR, Ffytche DH, Weintraub D, et al. Cognitive decline in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2017; 13(4): 217-31. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.27>

4. Reid WGJ, Hely MA, Morris JGL, Loy C, Halliday GM. Dementia in Parkinson's disease: A 20-year neuropsychological study (Sydney multicentre study). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82(9): 1033-7. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.232678>
5. Chen H, Wang K, Scheperjans F, Killinger B. Environmental triggers of Parkinson's disease-implications of the Braak and dual-hit hypotheses. *Neurobiol Dis* 2022; 163: 105601. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105601>
6. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell* 2016; 167(6): 1469-80.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
7. Boertien JM, Pereira PAB, Aho VTE, Scheperjans F. Increasing comparability and utility of gut microbiome studies in Parkinson's disease: A systematic review. *J Parkinsons Dis* 2019; 9(s2): S297-312. <https://doi.org/10.3233/JPD-191711>
8. Nishiwaki H, Ito M, Ishida T, Hamaguchi T, Maeda T, Kashihara K, et al. Meta-analysis of gut dysbiosis in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2020; 35(9): 1626-35. <https://doi.org/10.1002/mds.28119>
9. Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 2016; 65(3): 426-36. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308778>
10. Karlsson CLJ, Önnertfalt J, Xu J, Molin G, Åhrné S, Thorngren-Jerneck K. The microbiota of the gut in pre-school children with normal and excessive body weight. *Obesity* 2012; 20(11): 2257-61. <https://doi.org/10.1038/oby.2012.110>
11. Belzer C, de Vos WM. Microbes inside-from diversity to function: The case of *Akkermansia*. *ISME J* 2012; 6(8): 1449-58. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.6>
12. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 2017; 106: 171-81. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>
13. De Filippis F, Pasolli E, Tett A, Tarallo S, Naccarati A, De Angelis M, et al. Distinct genetic and functional traits of human intestinal *Prevotella copri* strains are associated with different habitual diets. *Cell Host Microbe* 2019; 25(3): 444-53.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.004>
14. Ndongo S, Armstrong N, Raoult D, Fournier PE. Reclassification of eight *Akkermansia muciniphila* strains and description of *Akkermansia massiliensis* sp. nov. and *Candidatus Akkermansia timonensis*, isolated from human feces. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25873-0>
15. Guo X, Zhang J, Wu F, Zhang M, Yi M, Peng Y. Different subtype strains of *Akkermansia muciniphila* abundantly colonize in southern China. *J Appl Microbiol* 2016; 120(2): 452-9. <https://doi.org/10.1111/jam.13022>
16. Almeida A, Nayfach S, Boland M, Strozzi F, Beracochea M, Shi ZJ, et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 2021; 39(1): 105-14. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3>
17. Arikan M, Yıldız Z, Kahraman Demir T, Yılmaz NH, Sen A, Hanoğlu L, et al. Axillary microbiota is associated with cognitive impairment in Parkinson's disease patients. *Microbiology Spectrum* 2022; 10(1): e02358-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02358-21>
18. Arikan M, Kahraman Demir T, Yıldız Z, Nalbantoğlu ÖÜ, Korkmaz ND, Yılmaz N, et al. Metaproteogenomic analysis of saliva samples from Parkinson's disease patients with cognitive impairment. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2023; 9(1): 86. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00452-x>
19. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30(15): 2114-20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
20. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* 2017; 27(5): 824-34. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
21. Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, et al. MetaBAT 2: An adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* 2019; 2019(7): e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>
22. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 2015; 25(7): 1043-55. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>



23. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011; 7(1): 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
24. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 2011; 17(1): 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
25. Olm MR, Brown CT, Brooks B, Banfield JF. dRep: A tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *ISME J* 2017; 11(12): 2864-8. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.126>
26. Emre M, Aarsland D, Brown R, Burn DJ, Duyckaerts C, Mizuno Y, et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007; 22(12): 1689-707; quiz 1837. <https://doi.org/10.1002/mds.21507>
27. Litvan I, Goldman JG, Tröster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC, et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord* 2012; 27(3): 349-56. <https://doi.org/10.1002/mds.24893>
28. Bengtsson-Palme J, Hartmann M, Eriksson KM, Pal C, Thorell K, Larsson DGJ, et al. metaxa2: Improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Mol Ecol Resour* 2015; 15(6): 1403-14. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12399>
29. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30(14): 2068-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
30. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015; 31(22): 3691-3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
31. De Filippis F, Pasolli E, Ercolini D. Newly explored *Faecalibacterium* diversity is connected to age, lifestyle, geography, and disease. *Curr Biol* 2020; 30(24): 4932-43.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.063>
32. Guo X, Li S, Zhang J, Wu F, Li X, Wu D, et al. Genome sequencing of 39 *Akkermansia muciniphila* isolates reveals its population structure, genomic and functional diversity, and global distribution in mammalian gut microbiotas. *BMC Genomics* 2017; 18(1): 800. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4195-3>
33. Kirmiz N, Galindo K, Cross KL, Luna E, Rhoades N, Podar M, et al. Comparative genomics guides elucidation of Vitamin B12 biosynthesis in novel human-associated *Akkermansia* strains. *Appl Environ Microbiol* 2020; 86(3): e02117-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02117-19>
34. Karcher N, Nigro E, Punčochář M, Blanco-Míguez A, Ciciani M, Manghi P, et al. Genomic diversity and ecology of human-associated *Akkermansia* species in the gut microbiome revealed by extensive metagenomic assembly. *Genome Biol* 2021; 22(1): 1-24. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02427-7>
35. Hertel J, Harms AC, Heinken A, Baldini F, Thinnies CC, Glaab E, et al. Integrated analyses of microbiome and longitudinal metabolome data reveal microbial-host interactions on sulfur metabolism in Parkinson's disease. *Cell Rep* 2019; 29(7): 1767-77.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.035>
36. Nishiwaki H, Ito M, Hamaguchi T, Maeda T, Kashihara K, Tsuboi Y, et al. Short chain fatty acids-producing and mucin-degrading intestinal bacteria predict the progression of early Parkinson's disease. *npj Park Dis* 2022; 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00328-5>
37. Amorim Neto DP, Bosque BP, Pereira de Godoy JV, Rodrigues PV, Meneses DD, Tostes K, et al. *Akkermansia muciniphila* induces mitochondrial calcium overload and  $\alpha$ -synuclein aggregation in an enteroendocrine cell line. *iScience* 2022; 25(3). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103908>
38. Liu Y, Liu Q, Zhang C, Zhao J, Zhang H, Chen W, et al. Strain-specific effects of *Akkermansia muciniphila* on the regulation of intestinal barrier. *Food Sci Hum Wellness* 2023; 12(5): 1526-37. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.02.022>