

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENOOMIKA INSTITUUT

**Hiiremudeli kasutamine inimese soolestiku mikrobioomi uurimiseks**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Claudia Maria Ruhno

Juhendajad

MSc Kertu Liis Krigul

PhD Elin Org

TARTU 2023

## **Hiiremudeli kasutamine inimese soolestiku mikrobioomi uurimiseks**

Inimese mikrobioomi analüüsimiseks kasutatakse tihti loommudeleid, millest levinuim on hiir. Üheks uurimismeetodiks on fekaalne mikrobioota siirdamine, mille teel kantakse inimese mikroobikooslus üle katselooma. Sellise meetodi kasutamine on mikrobioomi uuringutes levinud, kuid vähe on analüüsitud, kui informatiivne on katseloomana kasutatav hiir inimese mikroobikoosluste uurimiseks. Bakalaureusetöö raames analüüsiiti Eesti Mikrobioomi projekti (EstMB) doonorite väljaheiteproove ja fekaalse transplantatsiooni läbinud hiirte mikrobioomi enne ja pärast siirdamist. Analüüsi käigus leiti uurimisgruppide vahel märkimisväärseid erinevusi nii bakteriperekondade kui ka mikroobikoosluse mitmekesisuse tasandil. Täpsemate järelduste tegemiseks tuleks läbi viia metagenoomne analüüs, mis võimaldaks kooslusest tuvastada lisaks bakteritüvedele viiruseid ja eukarüote ning muid mikrobioomi komponente.

**Märksõnad:** mikrobioom, loommudelid, 16S rRNA geeni sekveneerimine, fekaaltransplantatsioon

**CERCS:** B220 Geneetika, tsütogeneetika  
B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

## **Using mouse model to study the human gut microbiome**

The human microbiome is frequently studied using animal models. The mouse is currently the most commonly used animal model. Fecal microbiota transplantation, in which the human microbiota is transferred to an experimental animal, is a common research method. Even though this method is often used in microbiome studies, little research has been done to determine how informative the mouse is for studying the human microbiome. The aim of this thesis was to analyze the human stools collected as part of the Estonian Microbiome project and mice's microbiomes before and after fecal microbiota transplantation. Significant variations between the analyzed groups were found, both in terms of microbial diversity measures and relative abundances of bacterial genera. To draw more precise conclusions, it would be helpful to do metagenome analysis that identifies viruses, eukaryotes, and other microbiome components.

**Keywords:** microbiome, animal models, 16S rRNA gene sequencing, fecal transplantation

**CERCS:** B220 Genetics, cytogenetics  
B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Inimese soolestiku mikrobiom .....	7
1.2 Inimese mikrobiomi varieeruvust mõjutavad faktorid .....	8
1.2.1 Antibiootikumid ja nende mõju mikrobiomile .....	9
1.2.2 Teised mikrobiomi mõjutavad faktorid .....	10
1.3 Mikrobiomi analüüsimeetodid .....	10
1.3.1 Mikroobse DNA analüüs .....	11
1.3.2 Loomudelid.....	12
1.3.2.1 Hiiremodelid ja nende võimalused mikrobiomi uurimiseks .....	12
1.3.2.2 Hiire ja inimese vahelised erinevused soolestiku mikrobiomi uurimiseks ....	15
1.3.2.3 Inimese fekaalse mikrobiota siirdamine hiirde.....	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1 Töö eesmärgid .....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Proovide kogumine ja hoiustamine .....	20
2.2.1.1 Inimeste väljaheiteproovide kogumine ja hoiustamine.....	20
2.2.1.2 Hiirte väljaheiteproovide kogumine ja hoiustamine .....	21
2.2.2 DNA eraldamine ja 16S rRNA geeni sekveneerimine .....	23
2.2.3 Mikroobikoosluse määramine.....	24
2.2.4 Statistiline analüüs .....	24
2.3 Tulemused .....	25
2.3.1 Mikrobiomi mitmekesisuse võrdlus erinevate uurimisgruppide vahel .....	25
2.3.2 Mikroobikooslus eri uurimisgruppide vahel.....	27

2.4 Arutelu .....	30
KOKKUVÕTE .....	35
RESÜMEE / SUMMARY .....	36
TÄNUSÕNAD .....	37
KIRJANDUSE LOETELU .....	38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	54
LISAD .....	55
LISA 1 .....	55
LISA 2 .....	56
LIHTLITSENTS .....	57

## KASUTATUD LÜHENDID

AB – antibiootikum (ingl *antibiotic*)

ASV – ampliconjärjestuste variandid (ingl *amplicon sequence variant*)

bp – aluspaar (ingl *base pair*)

EstMB – Eesti Mikrobiomi projekt (ingl *Estonian Microbiome Project*)

GF – mikroobivaba (ingl *germ-free*)

FMT – fekaaltransplantatsioon (ingl *fecal microbiota transplantation*)

OTU – operatiivne taksonoomiline ühik (ingl *operational taxonomic unit*)

PCA – peakomponentanalüüs (ingl *principal component analysis*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (ingl *polymerase chain reaction*)

QC – kvaliteetkontroll (ingl *quality control*)

S – Svedbergi ühik (ingl *Svedberg unit*)

SPF – kindla haigustekitaja vaba (ingl *specific pathogen-free*)

WT – metsiktüüp (ingl *wild-type*)

## SISSEJUHATUS

Inimese mikrobioomiks nimetatakse kindlas kehapiirkonnas olevaid mikroorganisme, mille hulka kuuluvad põhiliselt bakterid, viirused ja eukarioidid (Caporaso *et al.*, 2011). Mikrobioomi mõjutavad mitmed erinevad tegurid alustades elustiilist lõpetades geneetikaga (Round ja Mazmanian, 2009). Mikroobikooslusel on oluline roll ka inimese tervisele, mispärast on mikrobioomi mõju väljaselgitamine vajalik. Näiteks on sellel sajandil olnud kiires tõusutrendis haigused nagu diabeet ja rasvumine, mille puhul on leitud olulisi seoseid mikrobioomiga (Cooper *et al.*, 2019; Zhao, 2013).

Üheks mikroobikoosluste uurimismeetodiks on loomudelid, millest enim kasutatakse hiiri (Hickman *et al.*, 2017). Nende katseloomade põhilisteks eelisteks on kiire suguküpsuse saavutamine ja areng (Nguyen *et al.*, 2015). Ühe meetodina on kasutusel inimese mikrobioota fekaalne transplantatsioon (*fecal microbiota transplantation* – FMT) hiirde. Sellisel viisil on uuritud mitmeid haigusi, millel arvatakse olevat seos mikrobioomiga (De Groot *et al.*, 2017). Ometi on vähe analüüsitud, mil määral saab hiirte peal nähtud tulemusi tõlgendada inimese tervise kontekstis (Park ja Im, 2020). Selline informatsioon on vajalik, et teadustöö saaks veel enam lähtuda põhimõtetest, milleks on loomkatsete vähendamine, asendamine ja täiustamine (Russell ja Burch, 1959).

Töö eesmärgiks on analüüsida inimeste soolestiku mikroobikoosluse ülekandmise edukust hiirtele, kasutades selleks Eesti Mikrobioomi projektis (EstMB) osalenud geenidoonoritelt pärit väljaheiteproove. Mikrobioomi kindlakstegemiseks kasutati 16S rRNA geeni V3–V4 alade sekveneerimist. Käesolev töö on valminud geenitehnoloogia bakalaureuseõppekava raames Tartu Ülikooli loodus- ja täppisteaduste valdkonna genoomika instituudi mikrobioomika uurimisgrupis. Töö metoodilise osa katsed viidi läbi Umeå ülikoolis Rootsis. EstMB uuringule on antud luba TÜ inimuuringute eetikakomiteest (loa number 266/T10) ja Eesti bioetika ja inimuuringute nõukogust (loa number 1.1-12/17) Lisaks sellele on kõik uuringus osalejad andnud oma kirjaliku nõusoleku ja uuringus osalevad geenidoonorid on pseudoanonümiseeritud. Hiirkatseteks on nõusolek saadud Umeå ülikooli eetikakomiteelt (loa number Dnr A 14-2019).

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Inimese soolestiku mikrobiom

Inimese kehas ja selle pinnal leidub palju mitmesuguseid mikroorganisme, mille kooslust kindlas kehapiirkonnas nimetatakse mikrobiomiks. Sinna hulka kuuluvad peamiselt bakterid, eukarüoodid ja viirused (Caporaso *et al.*, 2011). Teadaolevalt on inimesel enda geenide arvuga võrreldes üle saja korra rohkem genee pärit bakteritelt (Shreiner *et al.*, 2015; Ursell *et al.*, 2012). Igal inimesel on erinev mikrobiomikooslus, mis võib ka igat indiviidi omamoodi mõjutada (Cooper *et al.*, 2019). Inimene saab oma esimese mikrobikoosluse ema sünniteedest või keisrilõikega sünni puhul naha pinnalt ja ümbritsevast keskkonnast (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Täiskasvanu seedekulgale sarnane mikrobiom kujuneb väikelapsel välja umbes kolmandaks eluaastaks (Barko *et al.*, 2018; Fuentes ja de Vos, 2016; Ursell *et al.*, 2012). Mikrobiom muutub elu jooksul pidevalt. Seda mõjutavad muuhulgas toitumine, ravimite kasutus, erinevad haigused, päritolu ja elustiil. Korduv antibiootikumide kasutus vähendab näiteks mikrobiomi mitmekesisust ja soodustab multiresistentsete haigustekitajatest bakterite levikut (Aasmets *et al.*, 2022; Mullen, 2014). Inimestel on eri kehapiirkondades erinev mikrobikooslus. Oma mikrobiom on olemas nahal, ülemistel hingamisteedel, seedekulgla ja suguorganitel (Lloyd-Price *et al.*, 2016). Igal inimesel esineb mikrobiomis talle omaseid variatsioone, kuid üldjoontes koloniseerivad keha eri piirkondi kindlad hõimkonnad. Kõige mitmekesisem on soolestiku mikrobiom, kus tervel inimesel domineerivad *Bacillota* (endise nimega *Firmicutes*) ja *Bacteroidota* (endise nimega *Bacteroidetes*) hõimkonnad. Oma osakaalult järgnevad neile *Actinomycetota* (endise nimega *Actinobacteria*) ja *Pseudomonadota* (endise nimega *Proteobacteria*) hõimkonnad (Reiss *et al.*, 2016). Immunoloogiliselt kategoriseeritakse inimest koloniseerivad mikroobid kolme põhigruppi – sümbiondid, kommensaalid ja patobiondid. Sümbiondid on mikroorganismid, mis on inimesele kasulikud ja saavad ka ise inimeselt kasu. Kommensaalid on neutraalsed organismid – ei too otsest kahju ega kasu. Patobiontideks nimetatakse potentsiaalselt tervisele kahjulikke mikroobe. Kui tasakaal erinevate bakterite vahel märkimisväärselt muutub, võib see viia patobiontide vohamiseni ja terviseprobleemide tekkeni ehk niinimetatud düsbioosini (O'Mahony *et al.*, 2009; Round ja Mazmanian, 2009).

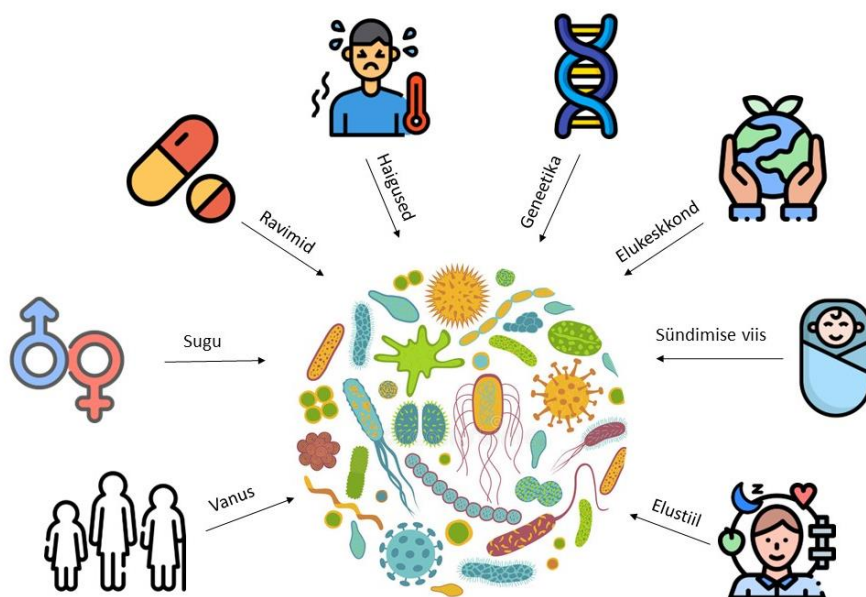
Mikroorganismidel on inimese normaalse elukvaliteedi säilitamisel kanda oluline roll. Kõige rohkem on mikroobe seedekulglas, kus toimub toitainete imendumine (Frank ja Pace, 2008; Ley *et al.*, 2008). Seal olevad mikroobid on võimelised sünteesima ensüüme, mille gene inimese genoomis pole. Nende abil lagundatakse mitmeid metabolismi jääke, nagu

polüsahhariide ja sünteesitakse vitamiine, näiteks K-vitamiini (Rowland *et al.*, 2018). Lisaks sellele reguleerivad mikroorganismid inimese immuunsüsteemi ja aitavad kaitsta haigustekitajate eest (Bosco ja Noti, 2021; Schären ja Hapfelmeier, 2021).

Mikrobioomi on seostatud erinevate haiguste tekkega nagu ainevahetushaigused (nt teist tüüpi diabeet), immuunsüsteemiga seotud haigused (nt põletikulised soolehaigused, astma), närvisüsteemiga seotud häired (nt autism, skisofreenia) ja erinevad vähivormid (Hartstra *et al.*, 2015; Louis *et al.*, 2014; Manichanh *et al.*, 2012; Tremlett *et al.*, 2017). Näiteks puuduvad osadel inimestel taimedest pärit polüsahhariidide lagundamiseks vajalikud bakterid. See on problemaatiline, kuna siis ei sünteesita neist lühikesi rasvhappeid, mis on olulised inimese normaalse seedetegevuse toimimiseks (Aw ja Fukuda, 2018). Teades patsiendi mikrobioomi, on ehk tulevikus võimalik ennetada ja diagnoosida eelpool nimetatud haigusi nende varajases staadiumis (Xu *et al.*, 2015).

## 1.2 Inimese mikrobioomi varieeruvust mõjutavad faktorid

Mikrobioomi kooslus on varieeruv ja sõltub paljudest erinevatest teguritest, mis võivad olla nii biootilised kui abiootilised. See võib oleneda näiteks elukeskkonnast, tarvitatud ravimitest, läbipõetud haigustest, elustiilist, vanusest, geneetikast, soost ja sündimise tüübist (Joonis 1). Oluliselt mõjutavad selle mitmekesisust ka mitmesugused ravimid, enim näiteks antibiootikumid (Bouma ja Strober, 2003; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).



**Joonis 1.** Mikrobioomi põhilised mõjutajad.

### 1.2.1 Antibiootikumid ja nende mõju mikrobiomile

Antibiootikumiks nimetatakse ainet, mis on toodetud kas mikroorganismide abil või sünteetilisel teel ja pärsib mikroobi kasvu (Zimdahl, 2015). Toimepõhimõtte järgi klassifitseeritakse ravimit bakteritsiidseks ehk bakterit tapvaks ja bakteriostaatiliseks ehk bakteri kasvu või paljunemist piiravaks. Ometi on piir nende kahe termini vahel ähmane, sest ka bakteriostaatiline antibiootikum võib baktereid tappa (Baquero ja Levin, 2021).

Esimesed kirjalikud allikad antibiootikumide kasutamisest ulatuvad 1550. aastasse enne meie ajaarvamist. Ravimite hulka kuulusid toona hallitanud leib ja ravimmuld (Haas, 1999). Esimeseks teadlikult kliinilisel eesmärgil kasutatavaks ja sünteetiliselt toodetud antibiootikumiks oli salvarsaan. Sellega raviti 20. sajandi algul süüfilist (Otten, 1986). Hiljem, 1928. aastal, avastas šoti päritolu bakterioloogia professor Alexander Fleming penitsilliini (Fleming, 1929). Selle antibiootikumi laiem kasutuselevõtt hoidis ära sõdurite massilise surma bakteriaalsetesse infektsioonidesse II maailmasõja ajal (Kardos ja Demain, 2011).

Bakteritele mõjub antibiootikum märklauapõhiselt. Peamisteks sihtmärkideks on rakuseina süntees (näiteks antibiootikumidel vankomütsiin, penitsilliin, tsükloseriin), DNA süntees (näiteks rifampitsiinil, kinoloonidil, novobiotsiinil) ja valgusüntees (näiteks tetratsükliinil, kanamütsiinil, puromütsiinil). Lisaks võivad märklauaks olla ka ainevahetusrajad nagu foolhappe metabolism või struktuursed üksused nagu tsütoplasma membraan (Madigan ja Martinko, 2006). Märklauad on olemas ka bakteritel, keda ei peeta antibiootikumide võtmisel sihtmärgiks. Seega vähendab nende tarvitamine lisaks patogeeni organismile omase mikrobiota mitmekesisust. On näidatud, et mida rohkem on inimene tarvitanud viimase kümne aasta jooksul antibiootikume, seda enam väheneb soolestiku mikroobide mitmekesisus (Aasmets *et al.*, 2022). Problemaatiline on see just laia spektriga antibiootikumide puhul (Dubourg *et al.*, 2014).

Mitmekesisuse vähenedes kahaneb ka soolestiku loomulik vastupanuvõime tulevaste patogeeni vastu, mis omakorda suurendab ravimitele resistentse tüve teket ja kasvu (Jakobsson *et al.*, 2010). Sellist mõju on täheldatud näiteks soolestikus infektsiooni tekitava bakteri *Clostridioides difficile* puhul (Abt *et al.*, 2016). Sellest bakterist vabanetakse antibiootikumide abil, kuid täieliku resistentsuse tekkel kasutatakse ravimisel ka fekaalset transplantatsiooni (Aslam *et al.*, 2005; Rao ja Safdar, 2016). Juba lühiajaline antibiootikumi tarvitamine võib tugevalt muuta mikroobide kooslust soolestikus. Näiteks vähendab klindamütsiini tarbimine ühe nädala jagu tugevalt *Bacteroides*'e ja enterokokkide hulka soolestikus ning soodustab antibiootikumile resistentsete geenide ja tüvede teket (Jernberg *et al.*, 2007; Lindgren *et al.*, 2009; Löfmark *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Teised mikrobioomi mõjutavad faktorid

Mikrobioomi mõjutab oluliselt ka toitumine (Yatsunenko *et al.*, 2012). Iga inimese toidulaud on isenäoline, mistõttu on sellest tulenevalt suuremal või vähemal määral erinev ka tema mikroobikooslus seedekulglas. Peamiselt on uuritud läänelike, vahemerelike ja taimsete dieetide mõju. Läänelik dieet (ingl k *Western-style diet*) kujutab endast töödeldud, kõrge loomarasva-, valgu-, soola- ja suhkrusisaldusega toitu, mis soodustab perekonna *Bacteroides* kasvu (Agriculture, 2003). Vahemeremaade süsivesikuterohke söögilaud loob soodsa keskkonna perekond *Prevotella* levikuks (Wu *et al.*, 2011). Taimetoitlased on oma dieedist välja jätnud liha (sh kala ja mereannid), mispärast võib nende mikroobikooslus olla selle võrra erinev eelnevatest (Wong *et al.*, 2018). Sõltuvalt domineerivast bakteriperekonnast eristatakse inimesel kolme enterotüüpi – *Prevotella*, *Bacteroides* ja *Ruminococcus*. *Prevotella* näol on tegemist kaitsva ja põletikuvastase toimega bakteriperekonnaga, *Bacteroides* soodustab põletikke ja on suure tõenäosusega seotud ainevahetushaigustega, *Ruminococcus* on oluline taimsete polüsahhariidide seedeprotsessis (La Reau ja Suen, 2018; Roager *et al.*, 2014). Klasterdumist enterotüüpideks seostatakse pikaajaliste toitumisharjumustega, bakteriperekonna *Prevotella* kõrgemat esinemissagedust on seostatud taimsete kiudainete tarbimisega ja *Bacteroides* perekonda vastavalt suure hulga loomset päritolu valkude ja küllastunud rasvhapete tarbimisega (Costea *et al.*, 2018).

Lisaks toitumisele on oma roll vanusel, sool ja geneetikal (Round ja Mazmanian, 2009). Inimese mikrobiom muutub elu jooksul pidevalt. Täiskasvanutele sarnane mikroobikoosluse muster saavutatakse umbes 3-aastasena (Yatsunenko *et al.*, 2012). Pidevat mikroobikoosluse muutlikkust ajas ilmestab näiteks hõimkonna *Pseudomonadota* (endise nimega *Proteobacteria*) esindatuse suurenemine inimese vananedes (Claesson *et al.*, 2011). Veel saab mikrobioomi nimetada endokriinseks organiks, sest toodab organismi toimimiseks vajalikke metaboliite, neurotransmittereid ja hormone (Clarke *et al.*, 2014). Lisaks sellele on ka geneetikal teatud mõju mikrobioomile. Katseliselt on näidatud, et ühemunakaksikute mikroobikooslus on omavahel sarnasem kui kahemunakaksikutel (Goodrich *et al.*, 2014). Samas ei peeta pärilikkust nii suureks mõjutajaks, kui seda on keskkonnast pärinevad faktorid (Kurilshikov *et al.*, 2021).

### 1.3 Mikrobioomi analüüsimeetodid

Mikroobide uurimiseks ja tuvastamiseks on aegade jooksul kasutatud erinevaid meetodeid. 17. sajandil kirjeldas hollandi kaupmees ja loodusteadlane Antoni van Leeuwenhoek mikroobe (ise nimetas neid animalkuliteks) üheläätselise mikroskoobiga (Lane, 2015). 19. sajandil kasvatati ja uuriti mikroobe erinevate söötmete abil (Prescott *et al.*, 2018). Sellised uurimismeetodid on

ajamahukad ega võimalda tuvastada kõiki organisme ja kuni siiani pole paljud mikroobid laboris kasvatatavad (Srinivasan *et al.*, 2015).

### 1.3.1 Mikroobse DNA analüüs

PCRi ja erinevate sekveneerimise tehnikate kasutuselevõtt edendas mikrobioomi uuringuid, sest sel moel saab analüüsida mikroobide DNAd ja informatsiooni ka laboritingimustes mittekasvatavate liikide kohta (Ames *et al.*, 2017). Peamiselt saadakse DNA tasemel informatsioon 16S rRNA geeni või kogu genoomi ehk metagenoomi analüüsil (Liu *et al.*, 2021).

16S rRNA geenideks nimetatakse ribosomaalset alaühikut kodeerivaid gene, mis on bakterites tugevalt konserveerunud. Konserveerunud alade vahel esineb hüpervarieeruvaid alasid, mis on unikaalsed igale bakteriliigile (Chen *et al.*, 1989). Hüpervarieeruvaid alasid on kokku üheksa (V1–V9) ja nende analüüsimiseks disainitakse konserveerunud aladele praimerid (Ghyselinck *et al.*, 2013). Teadlased ei ole jõudnud kokkuleppele, millised hüpervarieeruvad regioonid on efektiivseimad erinevate mikrobioomide analüüsiks (Barb *et al.*, 2016). Suu mikrobioomi analüüsimiseks kasutatakse tihti V1-V3 alasid (Zheng *et al.*, 2015). Muude piirkondade mikrobioomi analüüsimiseks soovitatakse sekveneerida mitmeid erinevaid varieeruvaid alasid (Barb *et al.*, 2016). Pärast primerite seondumist ja PCRi sekveneeritakse lühikesed (tavaliselt 200–400 aluspaari) alad ja tulemused kirjeldatakse operatiivsete taksonoomiliste üksustena (*operational taxonomic units* – OTU), mis identifitseerib mikroorganismi üldiselt perekonna tasandil (Dickson *et al.*, 2016; Ghyselinck *et al.*, 2013). Selle meetodi plussideks on analüüsi kiirus, biomassi vähene vajadus ja mikroobide eristatavus peremees DNAs. Samas on sellel ka omad puudused. Meetod sõltub primeritest ja PCRst, annab informatsiooni peamiselt perekonna tasandil ja väga vähese DNA korral võib anda valepositiivse tulemuse (Liu *et al.*, 2021). Alternatiivina kasutatakse mikroobide analüüsimisel järjest enam ampliconjärjestuste variante (*amplicon sequence variants* – ASV). Erinevalt OTUdest saab ampliconjärjestusi täpsemaks analüüsiks kasutada, sest liigitamine erinevatesse taksonitesse toimub otse, mitte järjestuste omvahelise kauguse põhjal (Callahan *et al.*, 2016; Nearing *et al.*, 2018; Schloss, 2021).

Metagenoomi (ingl *shotgun metagenomics*) analüüs kujutab endast proovi kogu genoomse materjali sekveneerimist (Sudarikov *et al.*, 2017). Meetodi eelisteks on, et selle abil saab tuvastada baktereid liigi või isegi tüve tasandil ja kirjeldada saab kogu mikrobikooslust, kus lisaks bakteritele on ka viiruse, alglooma või seene DNA. Samuti võimaldab meetod tuvastada, milliseid funktsioone mikroobne kooslus suudab läbi viia. Puuduseks on meetodi

kõrge hind, pärastine ajamahukas analüüs ja peremehe enda DNA saastuse oht (Liu *et al.*, 2021).

### **1.3.2 Loommudelid**

Inimese mikrobioomi olulisuse mõistmiseks kasutatakse palju ka loommudeleid. Vastavalt National Human Genome Research Institute'ile mõistetakse loommudeli all loomaliike (v.a inimene), keda kasutatakse biomeditsiinilistel eesmärkidel inimese uurimiseks. Selleks et katsed loommudelitega oleksid võrreldavad inimesega, peavad loommudelid oma ehituselt ja omaduselt olema inimesele sarnased (Franklin ja Ericsson, 2017; Knight *et al.*, 2017).

Esimesed teadaolevad allikad loommudeli kasutamisest ulatuvad Vana-Kreekasse, näiteks uuriti koerte abil 6. sajandil eKr aju ja selle tähtsust organismis. Erasistratus, kes oli oma elukutselt arst, kasutas veresoonekonna kirjeldamiseks esimest korda ajaloos katsealustena elusaid loomi. Euroopasse jõudis teadmine loommudelite kasutamisest kaubateid pidi. Mida tavapärasemaks muutusid loomkatsed, seda rohkem saadi teada inimese anatoomia, füsioloogia ja tervise kohta. Nii lükati 14.-16. sajandil ümber mitmed Vana-Kreeka teooriad (Ericsson *et al.*, 2013).

Teadaolevalt kasutas 16. ja 17. sajandi füsioloog William Harvey oma uuringutes erinevaid loomaliike, mille hulka kuulusid kalad, kanad ja tuvid. Loomade omavahelisel võrdlemisel kirjeldas ta väga detailselt erinevaid füsioloogilisi süsteeme, sealhulgas kardiovaskulaarset süsteemi (Ericsson *et al.*, 2013). Füsioloogia ja meditsiini Nobeli preemia võitnud August Krogh ütles 1929. aastal järgmist: “Paljude probleemide jaoks on olemas sobilikud loomad, kelle peal saab seda kõige mugavamalt uurida.” (Krogh, 1929).

#### **1.3.2.1 Hiiremudelid ja nende võimalused mikrobioomi uurimiseks**

Teaduses suurenes hüppeliselt loommudelite kasutuselevõtt 20. sajandi algul. Geneetik Clarence Cook Little sugulusaretas hiiri, et nad oleksid omavahel geneetiliselt võimalikult identsed (Ericsson *et al.*, 2013). Enim kasutatakse teadustöös näriliste seltsi kuuluvat koduhiirt, ld *Mus musculus*. Tema eeliseks on väiksus, kiire suguküpsuse saavutamine, lühike tiinus ja eluiga ning rahulik iseloom. Veel on rohkelt informatsiooni *Mus musculus*'e anatoomia, geneetika ja füsioloogia kohta. Hiire elundkonnad sarnanevad nii struktuurselt kui ka füsioloogiliselt inimese omadele, mistõttu kasutatakse teda enim inimese haiguste uurimisel ja ravimite testimisel (Hickman *et al.*, 2017).

Üheks loodud hiiremudeliks mõistmaks mikrobioomi ja peremehe vahelisi seoseid on mikroobivabad hiired (*germ-free* – GF) (Manca *et al.*, 2020). Esimesed mikroobivabad näriliste

kolooniad aretati välja 1940. aastatel (Yi ja Li, 2012). GF hiirtel puudub igasugune kokkupuude mikroobidega. Neid hoitakse terve elu steriilsetes tingimustes – isoleeritud vivaariumid, steriliseeritud toit ja jook, pidev kontaminatsioonikontroll jms (Kennedy *et al.*, 2018). Selliste hiirte soetamine ja pidamine on äärmiselt kulukas ning kindla väljaõppega töötajaid vajav (Lundberg *et al.*, 2016). Seepärast pole GF katseloomad paljudele teadlastele kättesaadavad. Samuti sobivad mikroobivabad tingimused vaid kindla genotüübiga hiireliinidele, mis seab katsetele omad piirangud (Kennedy *et al.*, 2018).

Alternatiivina mikroobivabale GF mudelile on välja töötatud ka teine mikroobivaba hiiremudel ehk antibiootikumidega töödeldud hiiremudel. Sellised hiired ei pea terve elu kasvama steriilsetes tingimustes (Ellekilde *et al.*, 2014). Nad on tavaliselt metsiktüüpi (*wild type* – WT) või kindlate patogeenide vaba (*specific pathogen-free* – SPF) mikroobikooslusega hiired. SPF hiired erinevad metsiktüüpi hiirtest selle poolest, et neil puuduvad teatud tüüpi patogeenid (viirused, bakterid ja parasiidid) (Foster, 1959). Neid hoitakse mikroisoleeritud või individuaalselt õhutatud puurides. Hiirtega kokkupuutuv, nt toit, vesi ja muu tehnika desinfitseeritakse või steriliseeritakse vastavalt katsenõuetele (Masopust *et al.*, 2017). Mikroobivabaks tehakse hiired laia spektri antibiootikumide abil, mida manustatakse kas joogivee kaudu, suukaudselt või kombinatsioonina kahest eelmisest (Reikvam *et al.*, 2011). Enim kasutatakse antibiootikumide segusid, mis vähendavad grampositiivsete, gramnegatiivsete ja anaeroobsete bakterite hulka (Grasa *et al.*, 2015; Reikvam *et al.*, 2011; Zákostelská *et al.*, 2016). Joogivees jääb sõltuvalt antibiootikumist kontsentratsioon 0,15–2 g/l vahemikku ja kuur kestab nädal kuni kümme nädalat (Kennedy *et al.*, 2018). Sellisel teel tarbivad hiired seda *ad libitum*, mistõttu varieerub doosi kogus (Reikvam *et al.*, 2011). Sageli segatakse vee hulka suhkrut, et varjata ravimi mõru maitset (Abt *et al.*, 2012; Baldrige *et al.*, 2015; Emal *et al.*, 2017). Sellele vaatamata võivad hiired selle joomist endiselt vältida (Hill *et al.*, 2010; Reikvam *et al.*, 2011; Zákostelská *et al.*, 2016). Vedelikupuuduse vältimiseks ja doosi kontrollimiseks kasutatakse rohkem suukaudset või kombineeritud manustamist (Kuss *et al.*, 2011; Reikvam *et al.*, 2011). Esimesel juhul on kuuri kestus keskmiselt 3–10 päeva ja teisel 7–21 päeva (Kennedy *et al.*, 2018). Osad teadlased lisavad ravikuuri ka seeninfektsioonide vastased ravimid, et vältida nende teket (Grasa *et al.*, 2015; Reikvam *et al.*, 2011; Zákostelská *et al.*, 2016).

Mõlemale mudelile – GF ja antibiootikumidega töödeldud hiirtele – saab üle kanda huvipakkuva kooslusega mikrobiota (Lundberg *et al.*, 2016). Ühesuguse mikrobiota üle kandmisel võivad tulemused siiski varieeruda, sest nii mikroobivaba kui ka antibiootikumidega töödeldud hiire füsioloogia ja mikrobiota on üksteisest ja metsiktüüpi hiirtest erinev (Kennedy

*et al.*, 2018). Seedeptsessi kiirus antibiootikumidega töödeldud hiire ja GF-i peensooles on madalam kui WT hiirel, proliferuuvate rakkude arv väiksem, soolehatud peenemad ja T-rakke esineb vähem (Bayer *et al.*, 2019; Ekmekciu *et al.*, 2017; Reikvam *et al.*, 2011). WT ja antibiootikumiga töödeldud hiire umbsool on tavapärasest suurem, limaskesta pärisikiht on õhem, hatud pikemad ja paksemad ning lühikeste rasvhapete hulk on väiksem (Corbitt *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2016). Miroobivabal esineb vähem põletikke võrreldes antibiootikumidega töödeldud hiirega (Bayer *et al.*, 2019). Samuti on maksas sapi tootmine ja molekulaarsed signaalirajad mõjutatud ning rakkude regeneratsioon aeglasem (Sayin *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014). Veel mõjutavad antibiootikumid ja mikroobide puudumine vereloomet. Mõlemal juhul langeb granulotsüütide ja monotsüütide tase ning tõuseb T-rakkude hulk. Antibiootikumidega töödeldud hiirel langeb ning GF-il tõuseb B-rakkude tase kehas (Bayer *et al.*, 2019).



GF

**EELISED:**

- Iga kude mikroobivaba
- Koloniseerimisel teada hiire kogu mikrobiota

**PUUDUSED:**

- Kulukas
- Vaja spetsiaalset varustust ja väljaõppega töötajaid
- Sobilik kindlatele genotüüpidele
- Pole kõigiks katseteks kättesaadav
- Hiirtel arenguhäired



Antibiootikumidega töödeldud hiir

**EELISED:**

- Soodne
- Pole vaja spetsiaalset varustust
- Sobilik iga genotüübi jaoks
- Kindlate bakterite eemaldamine võimalik
- Väljaarenenud immuunsüsteem

**PUUDUSED:**

- Osad mikroobid jäävad alles
- Mõju eukarüootsetele rakkudele
- Soodustab resistentsete bakterite ja seeninfektsioonide teket

**Joonis 2.** Mikroobivaba (*germ-free* – GF) ja antibiootikumidega töödeldud hiirte kasutamise eelised ja puudused mikrobiomi uuringutes.

Nii mikroobivabal kui antibiootikumikuuri läbinud mudelil on oma eelised ja puudused (Joonis 2). GF-i puhul on eeliseks, et hiir on igas koes mikroobivaba (Kennedy *et al.*, 2018). Seega teab teadlane terve katse vältel kogu hiire mikrobiota koostist. Samas on sellised mudelid kallid ja spetsiaalset käsitlust ja väljaõpet vajavad, sest steriilne keskkond peab olema tagatud terve hiire elu (Fontaine *et al.*, 2015; Nicklas *et al.*, 2015). Veel esineb sellistel hiirtel vääringuid ja kõik eksperimendid pole võimalikud (Kennedy *et al.*, 2018). GF hiirtel pole näiteks korralikult välja arenenud immuunsüsteem ja nende soole peristaltika on võrreldes WT

hiirtega aeglasem ja katkendlikum (Lundberg, 2019; Vincent *et al.*, 2018). Antibiootikumikuuri läbinud hiir on oma odavuse ja käsitlemise lihtsuse poolest teadlastele palju kättesaadavam (Kennedy *et al.*, 2018). Iga genotüübiga saab teha katseid ja eemaldada antibiootikumide abil teatud tüüpi või enamik baktereid (Hansen *et al.*, 2012). Siiski pole selline mudel täiesti mikroobivaba, sest antibiootikumid ei mõju viirustele, seentele ega resistentsetele bakteritele (Norman *et al.*, 2014). Vastupidiselt võib see hoopis soodustada resistentsete bakterite ja seeninfektsioonide teket (Noverr *et al.*, 2004; Ubeda *et al.*, 2010). Tulemused sama kuuri läbinud ja sama mudelite vahel võivad erineda, sest mikroobikooslus varieerub hiireti (Macpherson ja McCoy, 2015; Tremaroli ja Bäckhed, 2012). Inimese proovi fekaaltransplantatsiooni edukus hiirde on erinev. Mikroobivabadel hiirtel toimub koloniseerimine 44–70% ulatuses ja antibiootikumidega töödeldud hiirte puhul on FMTi efektiivsus 57–68% ja sõltub ülekantavast mikroobikooslusest (Chung *et al.*, 2012; Hintze *et al.*, 2014; Wos-Oxley *et al.*, 2012; L. Zhang *et al.*, 2017).

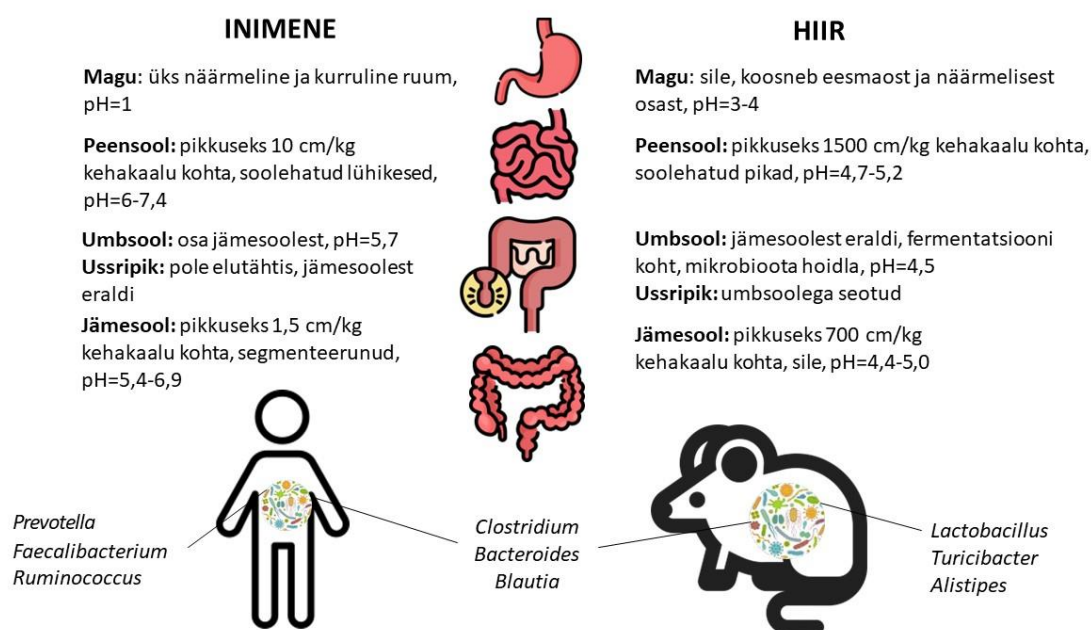
### **1.3.2.2 Hiire ja inimese vahelised erinevused soolestiku mikrobioomi uurimiseks**

Hiiremudelit on inimese mikrobioomi uuringuteks palju kasutatud, et aru saada mikrobioomi olulisusest ja funktsioonidest. Samuti on sellel roll erinevate haiguste uurimise jaoks. Hiiremudelites inimese mikroobikoosluse uurimisel on leitud seoseid mikrobioomi ja mitmete haiguste vahel nagu ülekaal, teist tüüpi diabeet, põletikuline soolehaigus ja allergiad. Hiiremudel annab eelise uurida soolestikus toimuvat invasiivsemalt ja kontrollitumalt võrreldes uuringutega inimestel (Nguyen *et al.*, 2015). Samas tuleb seejuures arvesse võtta inimese ja hiire erinevusi anatoomilisel, füsioloogilisel, geneetilisel, toitumise ja mitmetel muudel tasanditel.

Hiire ja inimese seedekulglala põhikomponendid on samad (Joonis 3). Selle moodustab suu, söögitoru, magu, peensool, jämesool ja pärak (Hugenholtz ja de Vos, 2018). Samuti on sarnane peen- ja jämesoole koe ehitus, koosnedes pinnaepiteelist, lihaskestast, submukoosast, närvipõimikust ning serooskestast. Rakutasandil on sarnasuseks enterotsüütide, karikrakkude, endokriinrakkude ja M-rakkude olemasolu peen- ja jämesooles (Treuting *et al.*, 2017).

Samas leidub üle 90 miljoni aasta tagasi lahknunud liikide vahel ka mitmeid erinevusi (Joonis 3) (Ernst ja Carvunis, 2018). Hiire magu on jagatud järgmisteks kaheks osaks: eesmaoks ja mao näärmeliseks osaks, mis on omavahel eraldatud. Eesmaos toimub maohappe eraldumine ja sealne pH väärtus on 3–4 (McConnell *et al.*, 2008). Mao näärmelises osas ajutiselt säilitatakse ja seeditakse toitu (Ghoshal ja Bal, 1989). Inimese magu koosneb ühest ruumist, milles eraldab maohapet näärmeline limaskest ja pH väärtus on keskmiselt 1. Kui lähtuda kehakaalust, siis on

hiire peensool 150 korda pikem kui inimese oma, vastavalt 1500 cm/kg ja 10 cm/kg (Hugenholtz ja de Vos, 2018). Ka mikrohatud hiire peensooles on pikemad kui inimesel. See pikkus suurendab peensoole eripinda, sest hiirel puuduvad erinevalt inimesest limaskestas kurrud (Treuting *et al.*, 2017). Kui inimese ussripik on lühike, u 6 cm ja elutähtsat funktsiooni ei oma, siis hiirel see seotud umbsoolega. Umbsool on pikk, u 3–4 cm ja oluline, sest seal paikneb osa mikrobiotat, mis kääratab taimset toitu ja sünteesib K- ja B-vitamiini (Hugenholtz ja de Vos, 2018; Nguyen *et al.*, 2015). Kääritamine, vitamiinide ja lühikeste rasvhapete süntees toimub inimesel segmenteerunud jämesooles (Macfarlane ja Macfarlane, 2012). Erinevalt inimesest on hiire jämesool sile ja pärasoolest väljuv väljaheide korrapärase struktuuriga (Sakaguchi, 2003).



**Joonis 3.** Hiire ja inimese seedekulglu võrdlus. Kolm kõige enam levinud bakterite perekonda hiire soolestikus on *Lactobacillus*, *Turicibacter* ja *Alistipes*. Inimesel on nendeks *Prevotella*, *Faecalibacterium* ja *Ruminococcus*. Hiirel ja inimesel on omavahel sarnaselt domineerival tasemel perekondi *Clostridium*, *Bacteroides* ja *Blautia*. Joonisel kujutatud seedeelundkonna ehitus on omasem inimesele, hiire seedeelundkonnal on teistsugune välimus.

Hiire ja inimese soolestikus domineerivad kaks hõimkonda – *Bacillota* (endise nimega *Firmicutes*) ja *Bacteroidota* (endise nimega *Bacterioidetes*) (Eckburg *et al.*, 2005). Omavahel DNA järjestuselt identseid mikroobseid geene jagavad hiir ja inimene vaid 4% ulatuses. Sellele vaatamata on sarnased 80% funktsioonidest (Hugenholtz ja de Vos, 2018). Peamised muutused tulenevad füsioloogia, dieedi ja patogeenide erinevusest, mis mõjutavad suuresti kahe liigi mikroobikooslust. Inimeselt on eraldatud kuskil 1500 liiki, millest pooli on suudetud ka laboris

kasvatada (Lagier *et al.*, 2016; Rajilić-Stojanović ja De Vos, 2014). Hiirtel on suurusjärk umbes sama. Perekonniti domineerivad hiire soolestikus *Lactobacillus*, *Alistipes* ja *Turicibacter*. Inimesel on nendeks *Prevotella*, *Faecalibacterium* ja *Ruminococcus*. Nii inimese kui ka hiire soolestikus domineerivad umbkaudu samal määral perekonnad *Clostridium*, *Bacteroides* ja *Blautia* (Nguyen *et al.*, 2015). Samas võib samast liigist pärit elusorganismide vahel olla mikrobiom märkimisväärselt erinev. Erineva mikrobikoosluse järgi soolestikus jaotatakse nad vastavateks enterotüüpideks. Nagu eespool kirjeldati, võib inimese soolestiku mikrobiomi kooslust jagada kolmeks enterotüübiks – *Bacteroides*, *Prevotella* ja *Ruminococcus*. Ka hiirel on olemas enterotüübid. Omavahel on sarnane inimese *Bacteroides* ja hiire *Bacteroidaceae/Enterobacteriaceae* ning inimese *Ruminococcus* ja hiire *Lachnospiraceae/Ruminococcaceae* enterotüübid (Arumugam *et al.*, 2011).

Vabalt elav koduhiir on omnivoor. Tema toidulaud koosneb peamiselt erinevatest seemnetest, taimedest ja väiksematest loomsetest osadest (National Research Council *et al.*, 1995). Laborihiiri toidetakse enamjaolt taimse kuivsöödaga. Samas inimeste dieet on väga varieeruv. Leidub herbi-, omni-, karnivoore ja ka vahepeale jäävaid toitujaid (Nguyen *et al.*, 2015). Seetõttu on hiirtega stabiilsem teha katseid, sest terve katse vältel on laboritingimustes nende toit sama ja sellest tulenevalt toidust tingitud mikroobsed muutused minimaalsed. Lisaks toidule mõjutab mikrobikooslust ka ööpäevarütm. Kui inimesed toituvad tavaliselt päeval ajal, siis hiired on öised toitujad (Hugenholtz ja de Vos, 2018). Veel on väikestel loomadest hiirtel võrreldes suuremate loomadega kiirem ainevahetus. Kui inimesel võtab terve seedimise protsess söömisest väljutamiseni aega 14–76 h, siis hiirel 6–7 h (Cummings *et al.*, 1996; Hugenholtz ja de Vos, 2018). Erinevalt inimesest söövad hiired enda ja/või puurikaaslaste väljaheiteid (koprofaagid) ning viivad sel teel oma kehasse kas uuesti enda või kaaslaste mikroobe (Sakaguchi, 2003). Selline eluviis rikastab nende mikrobiomi ja võimaldab kätte saada toitaineid (K-, B-vitamiinid ja lühikesed rasvhapped), mida muul viisil on raske omandada (Lewin, 2009; Nguyen *et al.*, 2015).

### **1.3.2.3 Inimese fekaalse mikrobiota siirdamine hiirde**

Fekaalseks mikrobiota siirdamiseks nimetatakse protseduuri, mille käigus doonorilt (näiteks inimeselt) võetud fekaalne lahus sisestatakse retsipienti (näiteks hiirde). Selle käigus muudetakse osaliselt või täielikult retsiptendi mikrobiootat (Bakken *et al.*, 2011; Smits *et al.*, 2013). Läbi ajaloo on seda põhiliselt kasutatud inimese ravimisel ja mikrobiota uurimisel (De Groot *et al.*, 2017). Esimeste kirjalike allikate kohaselt kasutati sarnast meetodit esimest korda Hiina klassikalises meditsiinis 4. sajandil. Toona raviti suukaudselt manustatud värsket,

kuivatatud või kääritatud väljaheite abil kõhulahtisust ja toidumürgitust (Ali *et al.*, 2013; Gerke, 2014). 16. sajandil viis kirurg Acquapendente läbi esimese loomadevahelise transplantatsiooni, mida hakati edaspidiselt kasutama veterinaarmeditsiinis (Tetro ja Allen-Vercoe, 2016).

1990. aastatel võttis professor Jeffrey Gordon esimest korda inimese tervise ja mikroobioomivahelisi seoste uurimiseks kasutusele GF hiired (Bäckhed *et al.*, 2007). Inimese fekaalse mikrobioota siirdamist hiirtele on läbi viidud ka antibiootikumi teel mikroobivabaks tehtud ja metsiktüüpi hiirte peal (Barcena *et al.*, 2019; Shang *et al.*, 2022). Inimese väljaheite mikroobikoosluse siirdamine antibiootikumivabale hiirele toimub põhiliselt kahes osas: väljaheiteproovi ettevalmistamine ja retsiptendi ettevalmistamine. Esimese osa etappideks on inimeselt proovi kogumine, selle lahjendamine anaeroobses keskkonnas (nt PBS puhvri abil), homogeniseerimine, filtreerimine, tsentrifuugimine ja säilitamine. Teine osa jaguneb kaheks: esmalt läbib retsiptent antibiootikumikuuri ja pärast seda viiakse läbi fekaalne transplantatsioon (*fecal microbiota transplantation* – FMT) (Bokoliya *et al.*, 2021). Sellise FMTi abil on uuritud inimese mikrobioomi ja seeläbi leitud seoseid mikroobikoosluste ja erinevate haiguste vahel (De Groot *et al.*, 2017).

Sellel meetodil on ka mitmeid puuduseid, sest mikroobikooslus on mõjutatud väga paljude faktorite poolt. Vaatamata sellele, et inimesel ja hiirel on omavahel sarnaseid hõimkondi 90%-i ja perekondi 89%-i ulatuses, esineb mikroobe, mis on omased vaid ühele neist, mis seab FMTle omad piirid (Chung *et al.*, 2012; Krych *et al.*, 2013). Tulemusi mõjutab ülekandmise viis, uurimisobjektide arv ja ka väljaheite käsitlemise viis (Park ja Im, 2020). Kui värskelt võetud proovi hoida üle 24 tunni 37°C juures, väheneb perekondade *Ruminococcus 1*, *Faecalibacterium* ja suureneb *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus 2* ja *Eubacterium* hulk. Kõige arvukamaks jääb mikroobikooslus, kui FMTil kasutada värsket või maltodekstriini-trehaloosi lahuses -80°C juures külmutatud proovi (Burz *et al.*, 2019). Suureks mõjutajaks on ka toitumine. Kõige sarnasema tulemuse saamiseks tuleks hiire dieet muuta doonorile võimalikult sarnaseks (Jensen ja Ritskes-Hoitinga, 2007; Turnbaugh *et al.*, 2009). Enamasti toidetakse hiiri standardse kuivsöödaga, mis valmistatakse töötlemata koostisosadest ja on unikaalne. Ometi on neist leitud mitmeid saasteaineid, mis võivad mõjutada mikroobikooslust (nt raskemetallid) (Hrncir *et al.*, 2008; Jensen ja Ritskes-Hoitinga, 2007; Kozul *et al.*, 2008; Pellizzon ja Ricci, 2018). Veel on mitmed uuringud näitanud, et standardne kuivtoit pole toitainete osas ühesuguse koostisega (Lee *et al.*, 2023).

Sellele vaatamata on hiirte abil leitud seoseid mitmete ainevahetushaigustega, kuid mitte ainult. Lisaks on hiiremudelid aidanud leida seoseid mikrobioomi ja ülekaalu, ateroskleroosi, vähi ja mitmete muude haiguste vahel (Badran *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2019;

Lee *et al.*, 2019). Näib, et inimese mikrobioomi uurimiseks kasutatakse hiiremodelit küllaldaselt, kuid vähe on uuringuid selle kohta, kui informatiivsed need tulemused on tegelikkuses (Park ja Im, 2020). Uuritud on, milline efekt on erinevatel antibiootikumisegudel hiire mikroobivabaks tegemisel ja seda, kuidas erinevad mikroobikooslused hiire soolestikus hakkama saavad (Tan *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2019). Samas on sellise sisuga artikleid pigem vähem ja tegelikkuses oleks oluline teada, millises ulatuses saame hiiremodelites nähtud tulemusi üle kanda inimesele. Sellise teabe saamine oleks vajalik, et paremini planeerida, milline uurimismeetod on läbiviidava katse jaoks kõige sobivam.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Töö eksperimentaalse osa eesmärk on analüüsida inimeste soolestiku mikroobikoosluse ülekandmise edukust hiirtele, kasutades selleks Eesti geenivaramu geenidoonoritelt pärit väljaheiteproove.

Töö alameesmärgid on järgnevad:

1. Määrata hiire ja inimese väljaheiteproovidest soolestiku mikroobide kooslus 16S rRNA geeni V3–V4 piirkondade sekveneerimise abil;
2. Võrrelda omavahel hiire ja inimese soolestiku mikroobikooslusi;
3. Hinnata inimese soole mikroobikoosluse sarnasust hiirtega, kes on saanud fekaalse mikrobioota siirdamise inimeselt.

Bakalaureusetöö hüpoteesiks on, et inimese soole mikroobikoosluse üle kandmine hiirtele läbi fekaaltransplantatsiooni (*fecal microbiota transplantation* – FMT) muudab hiirte esialgse soole mikroobikooslust sarnasemaks inimese mikroobikooslusele.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Proovide kogumine ja hoiustamine

##### 2.2.1.1 Inimeste väljaheiteproovide kogumine ja hoiustamine

Bakalaureusetöö aluseks oleva hiirkatse jaoks vajalikud inimese väljaheiteproovid koguti geenidoonoritelt vabatahtlikkuse alusel Eesti Mikrobioomi projekti (EstMB) raames aastatel 2017–2019 (Aasmets *et al.*, 2022). Vabatahtlikud doonorid olid vanuses 23–89, kellest 1765 olid naised ja 745 mehed. Doonorid kogusid värske väljaheiteproovi Pasteuri pipetiga ning panid selle 15 ml polüpropüleeniga tuubidesse, mille tõid õppehoonesse, kus see järgnevalt -80°C juures külmutati. Hiirkatse jaoks kasutati kokku kaheksat EstMB doonori väljaheiteproovi. Katsesse valiti väljaheiteproovi ülekandmiseks hiirtele järgmised doonorid,

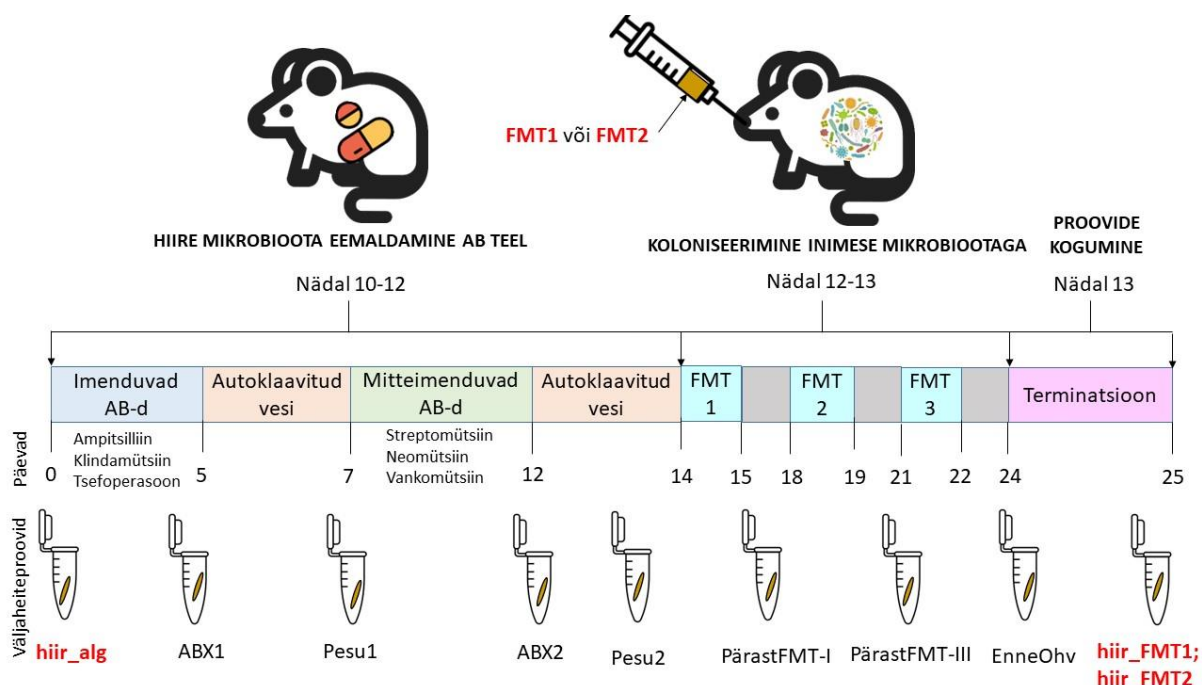
1. kes olid normaalkaalus (kehamassiindeks vahemikus 18,5–25 kg/m<sup>2</sup>),
2. kellel ei esinenud raskeid haigusi, mis mõjutavad alfa ja beeta mitmekesisust (nt I ja II tüüpi diabeeti, Crohni tõbe, põletikulise soole sündroomi jm) (Aasmets *et al.*, 2022 analüüside alusel),
3. kes ei võtnud mikrobioomi mitmekesisust (alfa ja beeta) mõjutavaid ravimeid (nt antidepressante, metformiini, simvastatiini) (Aasmets *et al.*, 2022 analüüside alusel),
4. kellel puudusid hooajalised allergiad,

5. kes ei olnud põdenud tsöliaakiat ega *Clostridium difficile* infektsiooni,
6. kes ei tarvitanud antibiootikume kuus kuud enne väljaheiteproovi võtmist,
7. kes polnud taimetoitlased ega veganid.

Eelnevatele kriteeriumitele vastavate doonorite hulgast valiti järgnevalt välja inimesed, kes olid viimase viie aasta jooksul teinud läbi vähemalt viis antibiootikumikuuri ( $n=4$ ). Neile valiti kehamassiindeksi, bioloogilise soo, vanuse, toitumisstiili ja väljaheitetüübi alusel terved kontrollid, kes polnud viimase 10 aasta jooksul antibiootikume tarbinud ( $n=4$ ). Keskmise doonori vanus kontrollgrupis oli  $45\pm 12,44$  ja antibiootikumikuuri läbinutel  $40,5\pm 12,42$  aastat. Seejärel valmistati valitud doonorite väljaheiteproovidest kaks segu (FMT1 ja FMT2), mida kasutati inimese mikrobiota väljaheite fekaalseks transplantatsiooniks C57Bl/6J hiiremudelisse. Esimese fekaalse transplantatsiooni segu (FMT1) moodustasid nelja kontrolli väljaheiteproovid ja teise segu moodustasid nelja antibiootikume tarvitanud inimeste proovid (FMT2). Inimeste proovide segud valmistati anaeroobsetes tingimustes ja selleks kasutati 100 mg inimese väljaheiteproovi 1 ml steriliseeritud PBSi kohta, millele oli lisatud 0,1% L-tsüsteiini ja 15% glütserooli. Segu inkubeeriti 10 minutit. Katseplani koostas TÜ doktorant Kertu Liis Krigul ja hiirkatse eksperimentaalsena viisid läbi Kertu Liis Krigul, Rachel Feeney ja Supapit Wongkuna Umeå ülikoolis Rootsisis. EstMB uuringule on antud nõusolek TÜ inimuuringute eetikakomiteest (loa number 266/T10) ja Eesti bioetika ja inimuuringute nõukogu (loa number 1.1-12/17) ning kõik uuringus osalejad on andnud oma kirjaliku nõusoleku ning on pseudoanonümiseeritud. Hiirkatse luba on saadud Umeå ülikooli eetikakomiteelt (loa number Dnr A 14-2019).

### **2.2.1.2 Hiirte väljaheiteproovide kogumine ja hoiustamine**

Hiirkatseks kasutati C57Bl/6J liini emaseid ( $n=8$ ) ja isaseid ( $n=8$ ) hiiri, kes olid katse alguses 10 nädala vanused. Neid hoiti patogeenvabades tingimustes, mis tähendab, et igal vivaariumil oli oma isiklik tuulutussüsteem. Ühes vivaariumis elas korraga neli hiirt. Hiirte hoiuruumi temperatuur jäi vahemikku 21–23 °C ja ööpäevas oli neil 12 tundi valget ja 12 tundi pimedat aega. Hiired said tarbida autoklaavitud vett ja standardset kuivtoitu (ingl *standard chow diet*) *ad libitum*. Hiirkatse plaan on välja toodud Joonisel 4.



**Joonis 4.** Kogu eksperimendi ajatelg koos proovide nimedega. Bakalaureusetöös analüüsitakse hiireproovidest punasega märgitud proove – töötlemata hiiri ehk hiir\_alg (n=16), hiir\_FMT1 (n=8) ja hiir\_FMT2 (n=8). Analüüsitakse ka inimeste fekaaltransplantatsioonisegusid – FMT1 ja FMT2. Esimese inimese fekaaltransplantatsioonisegu (FMT1) kanti üle hiir\_FMT1 ja teine (FMT2) hiir\_FMT2 proovidele.

Enne fekaalse mikrobioota transplantatsiooni muudeti hiired mikroobivabaks joogivette lisatud antibiootikumide teel, mida annustati kahe perioodi vältel. Esimese kuuri segu sisaldas kergesti imenduvat ampitsilliini (1 mg/l), klindamütsiini (1 mg/l) ja tsefoperasooni (0,5 mg/l), mida manustati neile viis päeva. Sellele järgnes kahe päeva pikkune vaheperiood, kus autoklaavitud joogivesi oli antibiootikumivaba. Teise kuuri segu koosnes sooles mitteimenduvatest antibiootikumidest, milleks olid streptomütsiin (1 mg/ml), neomütsiin (1 mg/ml) ja vankomütsiin (0,5 mg/ml), mida manustati kokku viis päeva. Sellele järgnes taas kahepäevane vaheperiood.

Pärast viimast vaheperioodi viidi läbi inimese mikrobioota fekaaltransplantatsioon hiirtesse. Hiirtele manustati inimeste väljaheiteproovi segu suukaudse sondi abil. Pooltele katseloomadest ehk kaheksale kanti 200 µl FMT1 mikroobitakooslust ja ülejäänud pooltele 200 µl FMT2 mikroobitakooslust. FMTi korrati kahes osas ja kordustes kasutati esimeseks ülekandeks valmistatud segu. Esimene kordus toimus neli päeva pärast esimest FMTi ning teine kordus kolm päeva pärast teist FMTi. Seega kokku kanti hiirtele sama segu kolm korda.

Hiired ohverdati kaela dislokatsiooni meetodil kümme päeva pärast esimest FMTi. Ohverdusel koguti hiirte jämesoole lõpuosast väljaheiteproovid. Kahel hiirel (üks hiir FMT1 grupist ja teine FMT2 grupist) oli terminatsiooni järel sool tühi ja nende puhul võeti katsesse proovid, mis olid kogutud päev enne ohverdamist (EnneOhv). Väljaheiteproove võeti ka

jooksvalt, pärast olulisemaid etappe, mida on näha Joonisel 4. Selles töös analüüsitakse vaid joonisel punaselt märgitud proove ja lisaks ka inimeselt pärit fekaaltransplantatsiooniks ette valmistatud segusid (Joonis 4).

### 2.2.2 DNA eraldamine ja 16S rRNA geeni sekveneerimine

Antud bakalaureusetöö raames analüüsiti 34-st väljaheiteproovist eraldatud bakteriaalset DNAd. Proovidest eraldati DNA, kasutades selleks DNA eralduskomplekti DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen, Venlo, Madalmaad). Eraldamisel järgiti tootja juhiseid. Lühidalt võeti protsessi esimeses etapis igast tuubist 200 mg väljaheiteproovi. Proovidele segati juurde CD1 lüüsilahus ja seejärel inkubeeriti neid 65°C juures 10 minutit. Seejärel lõhustati rakud Precellys 24 (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretinneux, Prantsusmaa) koepurustiga. Seade töötas 2500 rpm pöörete juures 2 x 30 sekundit, mille vahel olid 30-sekundilised pausid. Seejärel jätkati DNA eraldamist kitis olnud juhendi järgi. Komplektiga eraldati DNA ja RNA, mille kontsentratsioone hinnati 1 µl koguses NanoDrop™ 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Seejärel hoiustati DNA proove edaspidiseks kasutamiseks -20°C juures. DNA eraldamine tehti ka negatiivselt kontrollilt, mille kontsentratsioon oli 0 ja mida seepärast edasisse analüüsi ei võetud. DNA proovide eralduse viis läbi Tartu Ülikooli biomeditsiini magistrant Linda Sootak. Bakalaureusetöös käsitletakse ainult DNA proove, mille kontsentratsioonid on välja toodud Lisas 1.

DNA sekveneerimine ja selleks vajaliku raamatukogu tegemine teostati Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris. Amplifikatsiooniks kasutati primereid 337F ehk 16S\_F (5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3') ja 805R ehk 16S\_R (3' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAC TACHVGGGTATCTAATCC - 5'), mille abil sekveneeriti prokarüootse 16S rRNA geeni V3–V4 ala. Kogu sekveneerimise protsess teostati standardse protokolliga järgi. Raamatukogu koostati mõlemasuunalistest järjestustest (2 x 301 bp), mis sekveneeriti Illumina teise põlvkonna (Illumina, San Diego, USA) MiSeq süsteemi koos MiSeq reagentide komplektiga (MiSeq Reagent Kit versioon v3). Samaaegselt sekveneeriti kõik 34 proovi (*multiplex*-režiimis), mis olid varustatud spetsiaalsete ribakoodidega. Kasutades Illumina bcl2fastq2 Conversion tarkvara (versioon 2.20) viidi toorandmete järjestused vastavusse kindlate proovidega.

### 2.2.3 Mikroobikoosluse määramine

Bioinformaatiline analüüs teostati programmiga QIIME2 (versioon 2021.11). Enne QIIME2 programmi kasutamist koondati sekveneerimisandmed *manifest* dokumenti. Seejärel kasutati skripti *qiime tools import* skripti sisendvormingus PairedEndFastqManifestPhred33. Kvaliteedikontrollis (*quality control* – QC) filtreeriti QIIME2 programmis DADA2 tarkvara abil välja mürarikkad piirkonnad. Selles etapis ühendati ka päri- ja vastassuunalised lugemid. Lugemite kvaliteediskoori järgi kärbiti välja ebasobivad lugemite piirkonnad. Pärisuunalised lugemid kärbiti 29. ja 228. positsioonist. Vastassuunaliste lugemite kvaliteediskoor oli madal, mistõttu jäeti need analüüsist välja. Konsensusfiltrit kasutades eemaldati osaliselt ühinenud ehk kimäär lugemid. Programmi MAFFT abil ühendati lugemid ampliconijärjestuste variantideks (*amplicon sequence variant* – ASV), misjärel jooksutati QIIME2 programmi skript *qiime feature-classifier* koos Bayes'i klassifitseerijaga. See töötas referentsjärjestuse järgi SILVA 16S V3–V4 v132\_99 andmebaasidest 99% sarnasuslävendiga. Koostati ka fülogeneetilised puud, milleks käivitati FASTTREE skript. Mikroobikoosluse määras Tartu Ülikooli biomeditsiini magistrant Linda Sootak.

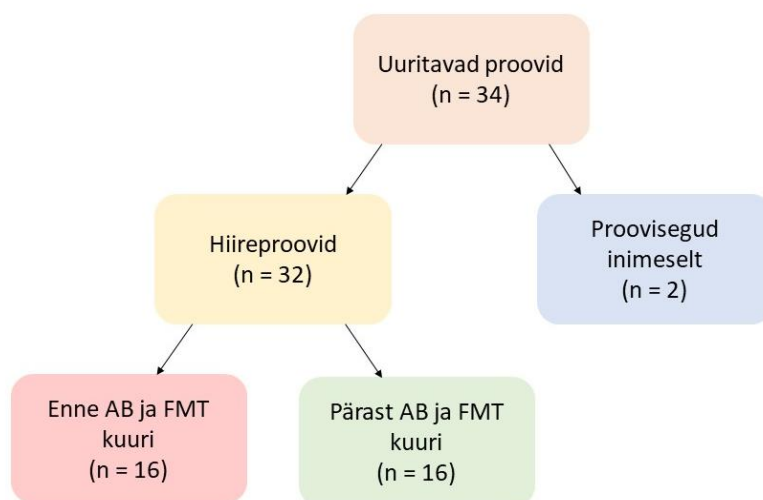
### 2.2.4 Statistiline analüüs

Statistilised analüüsid tehti programmides R (versioon 4.2.3) ja RStudio (versioon 2023.3.0.386). Lisapakettideks olid *dplyr* (versioon 1.1.1), *phyloseq* (versioon 1.42.0), *microbiome* (versioon 1.20.0), *vegan* (versioon 2.6.4), *ggsci* (versioon 3.0.0) ja *ggpubr* (versioon 0.6.0). Jooniste tegemiseks kasutati paketti *ggplot2* (versioon 3.4.1). Kokku analüüsiti 32 hiire proovi, millest 16 võeti hiirtelt enne ABde ja FMTi kuure ning 16 proovi 14 pärast kõiki kuure ja hiirte ohverdumist.

Väljaheiteproovide taksonoomilise mitmekesisuse kujutamiseks kasutati alfa- ja beetamitmekesisust. Esimene neist kirjeldab mikrobioota proovisest taksonoomilist mitmekesisust, teine näitab proovidevahelisi erinevusi. Alfamitmekesisust mõõdeti kasutades Shannoni mitmekesisuse indeksit ja vaadeldud perekondade arvu. Omavahel võrreldi WT hiirte (hiir\_alg) ja FMTi (hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2) läbinud hiirte väljaheidetest saadud mikroobikooslust ja statistiliselt olulised erinevused hiiregruppide vahel leiti kasutades t-testi. Mõlemad graafikud on koostatud bakteriperekondade tasemel ning kasutatud *phyloseq* (versioon 1.42.0) programmi. Beetamitmekesisuse arvutamiseks kasutati tsentreeritud log-suhte (*Centred Log-Ratio* – CLR) transformeeritud andmete peakomponentanalüüsi (*principal component analysis* – PCA).

## 2.3 Tulemused

Uuringus analüüsiti kokku 34 väljaheiteproovi, millest 32 kuulusid hiirtele ja kaks proovisegu olid pärit inimestelt (Joonis 5). Hiireproovid jagunesid omakorda kaheks: 16 proovi võeti 10-nädalastelt hiirtelt enne igasugust töötlemist ja 16 proovi 13-nädalastelt hiirtelt, kes olid läbinud kõik töötlemise etapid (sh antibiootikumikuuri ja fekaaltransplantatsiooni) ja olid termineeritud. DNA keskmine kontsentratsioon hiir\_alg proovides on  $101,5 \pm 49,08$  ng/ $\mu$ l (vahemik 40,6–219,4 ng/ $\mu$ l), hiir\_FMT1 proovides on selleks  $190,9 \pm 132,39$  ng/ $\mu$ l (vahemik 58,5–437,4 ng/ $\mu$ l), hiir\_FMT2 proovides  $135,3 \pm 40,99$  ng/ $\mu$ l (vahemik 47,3–179,5 ng/ $\mu$ l) ja inimese proovisegudes  $27,4 \pm 4,67$  ng/ $\mu$ l. Uuringus analüüsitud 34 väljaheiteproovi DNA lugemite hulk oli kokku 3 364 067. Lugemitest moodustasid 1 492 363 töötlemata hiired, 1 679 730 ABi ja FMTi kuuri läbinud hiired ja 191 974 inimese proovisegud. Keskmine lugemite arv töötlemata hiirtel (hiir\_alg) oli  $93\,273 \pm 23\,448,27$ ; ABi ja FMTi kuuri läbinud hiirtel (hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2)  $104\,983 \pm 12\,484,62$  ja  $95\,987 \pm 5744,54$  inimese proovisegudes (FMT1 ja FMT2). DNA kontsentratsioonid ja lugemite hulk on proovide kaupa välja toodud Lisas 1.

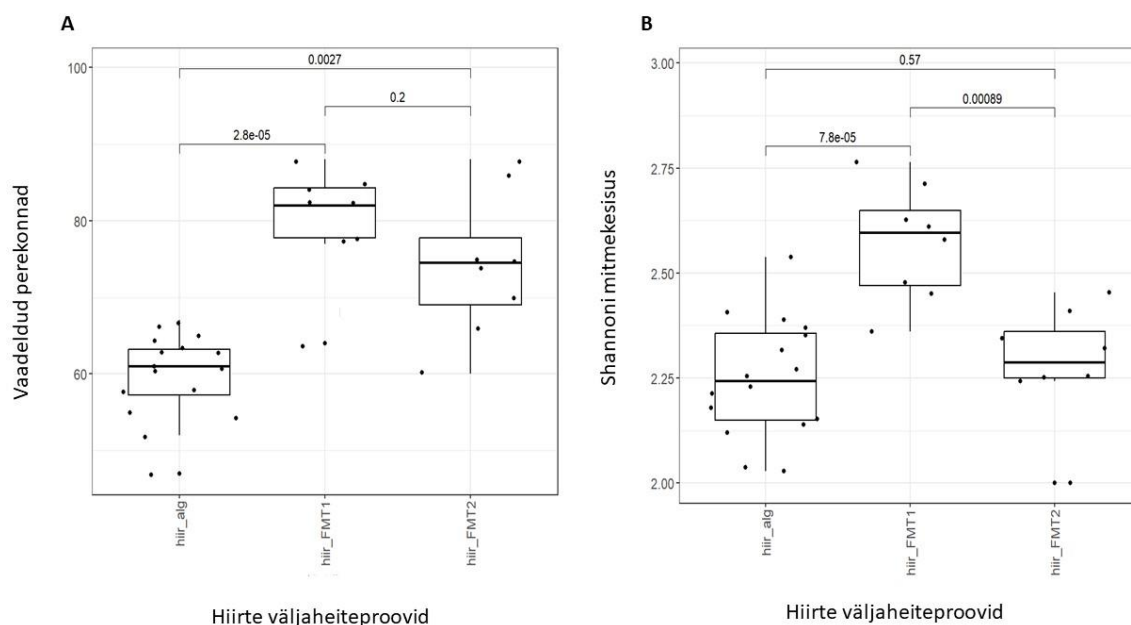


**Joonis 5.** Uuringute käigus analüüsitud väljaheiteproovid. Inimese proovisegu koosnes mõlemal juhul nelja inimese proovist.

### 2.3.1 Mikrobioomi mitmekesisuse võrdlus erinevate uurimisgruppide vahel

Käesolevas bakalaureusetöös hinnati alfamitmekesisust ehk grupisisest mitmekesisust uuritavate gruppide kaupa, kus seda kirjeldati nii vaadeldud perekondade arvu kui ka Shannoni mitmekesisuse indeksi abil. Lisaks analüüsiti beetamitmekesisust ehk gruppide omavahelisi mikroobikoosluste erinevusi.

Kõikide vaadeldud hiirte väljaheiteproovide perekondade keskvärtus oli  $68,5 \pm 11,34$  (vahemik 47–88) ja Shannoni mitmekesisuse keskvärtus  $2,34 \pm 0,19$  (vahemik 2–2,77) (Joonis 6). Inimese proovide perekondade keskvärtus oli  $148 \pm 19,80$  ja Shannoni mitmekesisuse keskvärtus  $3,47 \pm 0,46$ . Grupiti jagunes perekondade keskvärtus järgmiselt: hiir\_alg oli  $59,8 \pm 5,52$  (vahemik 47–67); hiir\_FMT1 oli  $80 \pm 7,39$  (vahemik 64–88) ja hiir\_FMT2 oli  $74,3 \pm 9,39$  (vahemik 60–88). Shannoni mitmekesisuse keskvärtused grupi kaupa on järgmised: hiir\_alg on  $2,25 \pm 0,14$  (vahemik 2,03–2,54); hiir\_FMT1 on  $2,57 \pm 0,14$  (vahemik 2,36–2,77) ja hiir\_FMT2 on  $2,29 \pm 0,14$  (vahemik 2–2,45).

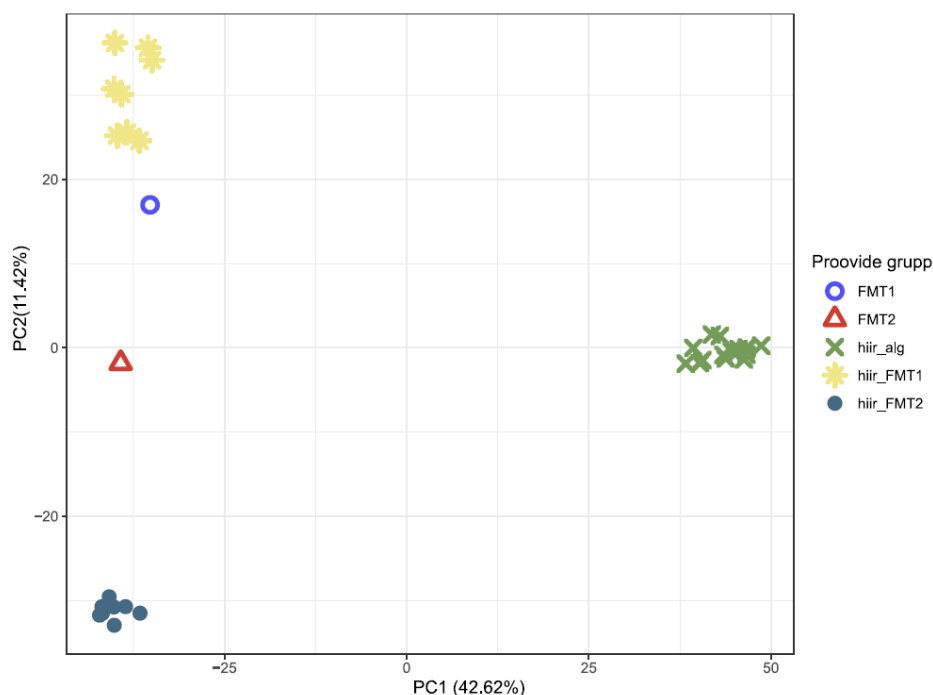


**Joonis 6.** Alfamitmekesisuse väärtused hiirtes, keda pole töödeldud ehk hiir\_alg (n=16) ja kaks gruppi hiirtest, keda on töödeldud antibiootikumide ja FMTga ehk hiir\_FMT1 (n=8) ja hiir\_FMT2 (n=8). A – vaadeldud perekondade arv hiireproovis grupi kaupa; B – Shannoni mitmekesisuse indeksi väärtus hiireproovis grupi kaupa

Alfamitmekesisuse puhul erinevad oluliselt vaadeldud perekonna ja Shannoni mitmekesisuse indeksi järgi hiir\_alg ja hiir\_FMT1 (vaadeldud perekondade arvukus, p-väärtus =  $2,8 \cdot 10^{-5}$ ; Shannoni mitmekesisus p-väärtus =  $7,8 \cdot 10^{-5}$ ). Lisaks sellele on statistiliselt oluline vaadeldud perekondade arv hiir\_alg ja hiir\_FMT2 vahel (p-väärtus = 0,0027), Shannoni mitmekesisuse indeksi väärtused statistiliselt oluliselt ei erine (p-väärtus = 0,57). Küll aga on oluliselt erinev Shannoni indeksi väärtus hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2 proovide vahel (p-väärtus = 0,00089). Samas vaadeldud perekondade vahel statistilist olulisust ei olnud (p-väärtus = 0,2).

Lisaks analüüsiti ka beetamitmekesisust, et hinnata mikrobioomi koosluste sarnasust proovide gruppide vahel. Selle kujutamiseks kasutati peakomponentanalüüsi (PCA). Joonisel 7 on näha, et sama grupi proovid klasterduvad kokku. Nii on näha, et hiir\_alg grupid paiknevad

koos ning sarnaselt esinevad omavahel lähistikku ka kõik hiir\_FMT1 ja vastavalt ka hiir\_FMT2 proovid.



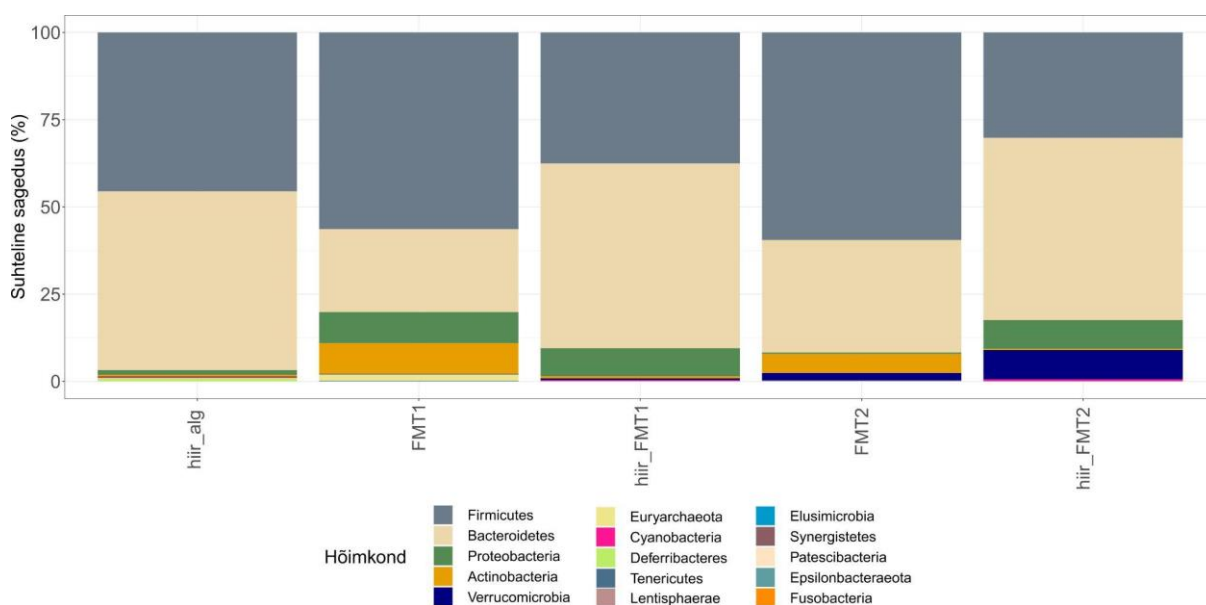
**Joonis 7.** Mikrobioomi beetamitmekesisuse peakomponentanalüüs väljaheiteproovides. Töötlemata hiired – hiir\_alg; antibiootikumi ja fekaaltransplantatsiooni läbinud hiired – hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2. FMT1 ja FMT2 proovid pärinevad inimestelt.

Peale selle on näha, et FMTi läbinud hiirte proovid (hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2) on rohkem sarnased inimeste proovidele kui algsetele WT hiirte proovidele (hiir\_alg). Seda näitab FMT1/FMT2 grupi suur kaugus hiir\_alg grupist x-teljel, mis kirjeldab põhilisi erinevusi gruppide vahel (PC1 42,62%). Inimese proovisegude ja FMTi läbinud hiirte vahelised erinevused ilmnevad peamiselt y-telje väärtuste suhtes ja selle olulisus võrreldes x-telje erinevustega on sekundaarne (PC2 11,4%). Omavahel klasterduvad FMT1 ja hiir\_FMT1. Ka proovid hiir\_FMT2 ja FMT2 on sarnased, kuid väiksemal määral, kui seda on FMT1 ja hiir\_FMT1. Samuti paiknevad inimese proovide segud selgelt hiire algproovidest lahus (Joonis 7).

### 2.3.2 Mikroobikooslus eri uurimisgruppide vahel

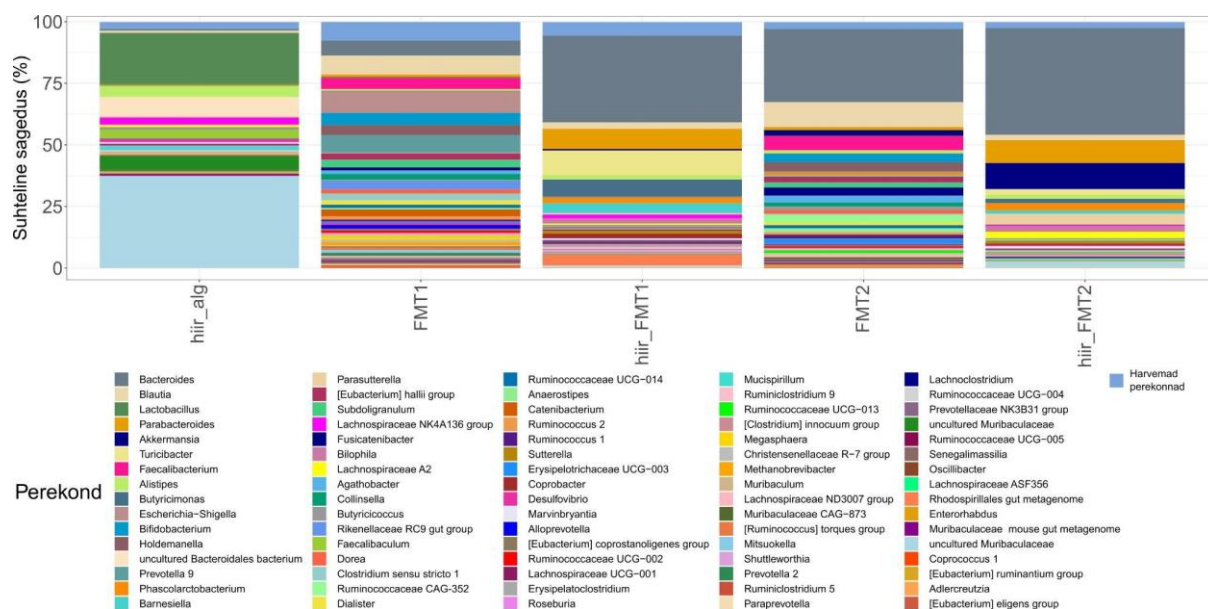
Olles kirjeldanud üldisi koosluste mitmekesisuse näitajaid, vaadeldi proovigruppide bakterikooslusi täpsemalt ka hõimkonna (Joonis 8) ja perekonna (Joonis 9) tasemel. Joonisel 8 on välja toodud proovigruppide hõimkonnad, millest domineerivamad olid *Bacillota* (endise nimega *Firmicutes*) ja *Bacteroidota* (endise nimega *Bacteroidetes*). WT hiirtel oli hõimkondadest arvukuselt kolmanda ja neljandana esindatud *Pseudomonadota* (endise nimega

*Proteobacteria*) ja *Deferribacteres*. Inimese proovisegus FMT1 oli veel *Pseudomonadota* ja *Actinomycetota* (endise nimega *Actinobacteria*) hõimkonna esindajaid, mis olid sarnaselt esindatud ka hiir\_FMT1 proovis. Teisest inimese proovisegust nimega FMT2 leiti hõimkondadest samuti *Actinomycetota* ja neljas enim esindatud oli *Verrucomicrobia*. Ka need hõimkonnad olid esindatud hiir\_FMT2 proovis, ent *Verrucomicrobia* määr oli suurem kui *Pseudomonadota*.



**Joonis 8.** Enimlevinud bakterihõimkondade suhtelised sagedused erinevates väljaheiteproovide tüüpides. Proove oli grupiti järgnevalt: Hiir\_alg - 16, FMT1 - 1, hiir\_FMT1 - 8, FMT2 - 1, hiir\_FMT2 - 8 (joonise autor: Kertu Liis Krigul).

Võrreldes omavahel kõikide gruppide bakteriperekondade suhtelisi sagedusi, on näha, et WT hiire ehk hiir\_alg proovide segus olid kolm kõige levinumat bakteriperekonda mittekultiveeritud *Muribaculaceae* sugukonda kuuluv perekond (36,35%), perekond *Lactobacillus* (20,92%) ja teine täpsemalt määramata perekond *Muribaculaceae* sugukonnast (7,68%). Inimese proovisegus FMT1-s oli kolmeks enim esinenud perekonnaks *Escherichia-Shigella* (8,67%), *Prevotella* (8,19%) ja *Blautia* (7,71%). FMT1 prooviga fekaaltransplantatsiooni läbinud hiir\_FMT1 proovidest leiti enim *Bacteroides* (35,19%), *Turicibacter* (10,01%) ja *Parabacteroides* (8,22%) perekondi. FMT2-s oli kolmeks valdavaks perekonnaks *Bacteroides* (29,62%), *Blautia* (10,10%) ja *Faecalibacterium* (5,68%). FMT2 segu saanud hiir\_FMT2 proovidest nähti kõige rohkem perekondi *Bacteroides* (43,26%), *Akkermansia* (10,66%) ja *Parabacteroides* (9,25%) (Joonis 9). Hõimkondade ja levinumate perekondade suhtelised sagedused on täpsemalt kirjas Lisas 2.



**Joonis 9.** Enamlevinud bakteriperekondade suhtelised sagedused erinevates väljaheiteproovide tüüpides. Proove oli grupiti järgnevalt: Hiir\_alg - 16, FMT1 - 1, hiir\_FMT1 - 8, FMT2 - 1, hiir\_FMT2 - 8 (joonise autor: Kertu Liis Krigul).

Võrreldes WT hiire proovi (hiir\_alg) FMTi läbinud hiireproovidega (hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2), on näha, et sarnasus nende vahel on minimaalne (Joonis 9). Hiir\_alg proovis levinumate bakteriperekondade hulk hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2 proovides on väike. Näitena võib tuua hiir\_alg proovides domineerinud mittekultiveeritud *Muribaculaceae* sugukonda kuuluva perekonna, mille osakaal on lõpuks hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2 proovides vastavalt 0,31% ja 2,35%. Sarnaselt eelmisele näitele, on langenud ka perekonna *Lactobacillus* ja teise *Muribaculaceae* sugukonda kuuluva perekonna huk. Neid leidub suuremal hulgal ainult hiir\_FMT2 proovis suhtelise sagedusega 0,01%. Hiir\_alg proovis oli perekonna *Muribaculum* suhteline osakaal 1,45%, kuid puudus täielikult FMTi läbinud hiirtest. Kui inimese proovisegudest leiti *Agathobacter* perekond (FMT1 suhteline osakaal 1,31%; FMT2 suhteline osakaal 2,72%), siis mitte ühestki hiireproovist ei leitud. Inimese proovisegudest puudus *Lachnospiraceae* sugukonda kuuluv perekond, mis oli aga esindatud WT hiirtest ja FMTi läbinud hiirtest (suhtelised sagedused: hiir\_alg 2,87%; hiir\_FMT1 1,54% ja hiir\_FMT2 0,43%). FMTi läbinud hiirtel oli algse hiirega võrreldes tõusnud perekond *Blautia*, *Bacteroides* ja *Parabacteroides* suhteline sagedus, mille osakaalud olid suuremad ka inimese proovisegudes. Üle kandus inimese proovidest ka perekond *Phascolarctobacterium*, mis puudus hiir\_alg proovidest.

Ometi ei saa väita, et fekaaltransplantatsioon oli ideaalne. Inimese proovisegus FMT1 enim levinud perekonna *Escherichia-Shigella* suhteline osakaal hiir\_FMT1-s oli 0,18%. Perekonnad *Prevotella* ja *Faecalibacterium*, mille suhtelised osakaalud FMT1-s on vastavalt

8,19% ja 4,47%, puudusid hiir\_FMT1 proovist täielikult. Ka teises inimese proovisegus (FMT2) esinenud perekonnad *Faecalibacterium* ja *Holdemanella*, suhtelised osakaalud vastavalt 5,72% ja 3,78%, polnud esindatud hiir\_FMT2-s. Ebaõnnestus ka perekonna *Fusicatenibacter* ülekande hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2 hiirtele, mille suhtelised sagedused olid FMT1 segus 1,21% ja FMT2 segus 3,32%. Esimesest inimese proovisegust tuvastati 79 bakteriperekonda, millest 51 leiti ka hiir\_FMT1 proovidest (ülekande edukus 64,6 %) ja teisest inimese proovisegust leiti vastavalt 69 bakteriperekonda, millest 42 olid olemas ka hiir\_FMT2 segudes (ülekande edukus 60,9 %).

## 2.4 Arutelu

Töö eesmärkideks oli võrrelda omavahel hiire ja inimese soolestiku mikroobikooslusi ja hinnata inimese soole mikroobikoosluse sarnasust hiirtega, kes on saanud fekaalse mikrobioota siirdamise inimeselt. Selleks analüüsiti hiirte ja inimeste väljaheidetest saadud mikrobiomi kooslusi ning võrreldi omavahel WT hiirte, antibiootikumikuuri ja FMTi läbinud hiirte ning inimeste proovide mitmekesisust ja perekondlikku koosseisu.

Väljaheitelproovides tuvastatud perekondade arvu ja Shannoni mitmekesisuse indeksi keskväärtused näitavad inimeste proovides suuremat mikroobset mitmekesisust võrreldes hiirtega. Madalaim keskväärtus on töötlemata hiirtel (hiir\_alg), töödeldud hiirtel (hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2) on see kõrgem. Statistiliselt oluliselt madalam on nii vaadeldud perekondade arv kui ka Shannoni mitmekesisuse indeks hiir\_alg proovides võrreldes hiir\_FMT1 proovidega. Oluliselt kõrgem oli ka hiir\_FMT2 proovidest tuvastatud perekondade arv võrreldes hiir\_alg proovidega. Mitmekesisuse kasv pärast inimese mikrobioota ülekannet vihjab hiire bakterikoosluse sarnasemaks muutumist inimesega võrreldes hiire algproovidega. Siiski ei jõua ühestki hiir\_FMT proovist kummagi mitmekesisuse väärtus inimese mitmekesisuse väärtuste tasemele, mis annab vihje, et kõiki inimese bakterirühmi ei saa hiirde üle kanda. Oluliselt erinevad Shannoni mitmekesisuse alusel hiir\_FMT1 ja hiir\_FMT2 proovid. Selline erinevus võis tuleneda sellest, et FMT2 proovid pärinesid antibiootikume tarvitanud inimestelt ja antibiootikumid vähendavad mikroobikoosluse mitmekesisust (Aasmets *et al.*, 2022).

Beetamitmekesisuse peakomponentanalüüsilt on näha, et kokku klasterduvad kõik ühte gruppi kuuluvad proovid. Leiti, et esimene peakomponent kirjeldab ära 42,62%-i kogu varieeruvusest ja teine peakomponent 11,42%-i. PCA joonisel olid koos kõik töötlemata hiired (hiir\_alg), kõik FMT1 inimese proovisegu saanud hiired (hiir\_FMT1) ja kõik FMT2 proovisegu saanud hiired (hiir\_FMT2). See tähendab, et nende gruppide bakterikooslus on omavahel sarnane. Mõlemad FMTi läbinud hiirte grupid olid töötlemata hiirtest esimese põhikomponendi

suhtes eemal, mis näitab, et nendevaheline koosluse erinevus on suur. Inimeste proovisegud (FMT1 ja FMT2) erinevad FMTi läbinud hiirtest peamiselt teise põhikomponendi suhtes. FMT1 sarnaneb hiir\_FMT1 grupile nii esimese kui ka teise põhikomponendi osas. See näitab, et nende kahe grupi vahel esinenud varieeruvus ei olnud märgatavalt suur. FMT2 ja hiir\_FMT2 paiknevad üksteisest y-teljel rohkem eraldi, mis viitab sellele, et fekaalse mikrobioota siirdamisel esines kõrvalekaldeid FMT2 ja hiir\_FMT2 proovide vahel rohkem kui FMT1 ja hiir\_FMT1 vahel. Ka inimeste grupid erinevad suuresti töötlemata hiirte proovidest. Antud analüüsidega pole võimalik öelda, et FMT2-e ja hiir\_FMT2-e omavahelisel võrdlusel on FMT2 rohkem sarnasem FMT1-le kui hiir\_FMT2-le. Küll aga saab väita, et mikroobikoosluse varieeruvus esimese FMT1-e ja hiir\_FMT1-e vahel on üldiselt väiksem kui FMT2-e ja hiir\_FMT2-e vahel.

WT hiirte (hiir\_alg) proovides esines enim *Bacteroidota* (endise nimega *Bacteroidetes*), *Bacillota* (endise nimega *Firmicutes*), *Pseudomonadota* (endise nimega *Proteobacteria*) ja *Deferribacteres* hõimkondi. Selline hõimkondade jagunemine on ootuspärane kuivtoidulistele hiirtele, mida analüüsiti selles bakalaureusetöös (Kapoor *et al.*, 2022). Inimese proovisegudes olid samadeks enim levinud hõimkondadeks *Bacteroidota*, *Bacillota* ja *Actinomycetota* (endise nimega *Actinobacteria*). Esimeses inimese proovisegus oli veel hõimkond *Pseudomonadota*, mille kõrget taset seostatakse inimese kõrgema vanusega ja teises proovisegus hõimkond *Verrucomicrobia*, mille olemasolu on seletatav antibiootikumide kasutamisega (Claesson *et al.*, 2011; Dubourg *et al.*, 2013). Inimese proovisegusid saanud hiirtel olid enim levinud samad hõimkonnad, mis vastavates proovides. Seega oli hiire ja inimese vahel suur hõimkondlik sarnasus, mistõttu on keeruline FMTi edukust sellelt tasandilt hinnata (Krych *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022).

Perekondlikul tasemel olid töötlemata hiirtel levinuimateks *Muribaculaceae* sugukonda kuuluv perekond, *Lactobacillus* ja veel üks perekond *Muribaculaceae* sugukonnast. Selline tulemus on ootuspärane, sest *Lactobacillus* on hiirte sooles üks enim esinevatest perekondadest ning *Muribaculaceae* üks kõige arvukamalt esindatud sugukond (Lagkouvardos *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2015; Salzman *et al.*, 2002). Esimeses inimese grupis (FMT1) oli enim näha *Escherichia-Shigella*, *Blautia* ja *Prevotella* perekondi. *Prevotella* ja *Blautia* on inimese normaalses soolestikus ühed enim esindatud, *Escherichia-Shigella* tavajuhtudel üheks levinumaks pole (Nguyen *et al.*, 2015). Esimese inimese proovisegu (FMT1) saanud hiir\_FMT1 proovis olid enim levinuimateks bakteriperekondadeks *Bacteroides*, *Turicibacter* ja *Parabacteroides*. Kui perekond *Bacteroides* esineb samal määral nii inimeses kui ka hiires, siis *Turicibacter* on omasem hiire soole mikrobioomile. *Parabacteroides* on keskmiselt rohkem

levinud inimesel kui hiirel, mis näitab, et see perekond hiire sooles võis pärineda inimeselt. Teises inimese proovisegus esines perekondadest enim *Bacteroides*, *Blautia* ja *Faecalibacterium*. Need tulemused on ootuspärased, sest kõik need perekonnad on inimese soolestikus sageli esinevad (Nguyen *et al.*, 2015). Antibiootikumikuuri läbinud inimese proovisegu (FMT2) sai grupp hiir\_FMT2, kus perekonna tasandil paistsid enim välja *Bacteroides*, *Akkermansia* ja *Parabacteroides*. Tavaliselt on perekond *Akkermansia* hulk suurem inimestel ja selle perekonna hulgas on leitud soole limaskestast degradeeriv liik *A.muciniphila* ning inimesel on limaskestast paksus ja sünteesikiirus suurem kui hiirel (Gustafsson *et al.*, 2012; Wacklin *et al.*, 2014).

Mõistmaks antibiootikumikuuri mõju võrreldi omavahel enne antibiootikumikuuri saanud hiirte ja antibiootikumikuuri ning fekaalse transplantatsiooni läbinud hiiri. Tavapäraselt kasutatakse sellistes katsetes antibiootikume, mis võimalikult suure osa bakterikooslusest hävitaks (Kennedy *et al.*, 2018). Antud katses kasutatud ampitsilliin ja vankomütsiin inhibeerisid grampositiivsete bakterite rakukestast sünteesi, neomütsiin, streptomütsiin ja klindamütsiin surusid maha valgusünteesi, tsefroperasoon pärssis bakteri kasvu ja paljunemist (Antonoplis *et al.*, 2019; Kohanski *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2018; Zuo *et al.*, 2021). Nendel antibiootikumidel on olnud mõju hiire mikroobikooslusele. Kui töötlemata hiirtes olid enim levinud perekondadeks *Muribaculaceae* sugukonda kuuluvad perekonnad ja *Lactobacillus*, siis antibiootikumikuuri ja fekaalse mikrobioota siirdamise läbinud hiirte proovides oli nende hulk minimaalne või olematu. Samas on klassifitseerimata *Lachnospiraceae* sugukonda kuuluvat perekonda on ABi kuuri ja FMTi läbinud hiirtes (ainult hiir\_FMT1) endiselt alles 54% -i algsest koosseisust, mis oli töötlemata hiirtes. See võib tähendada, et antibiootikumikuur ei muutnud hiiri täielikult mikroobivabaks. Metagenoomse analüüsi teel on leitud sugukond *Lachnospiraceae* ühes genoomis aminoglükosiid-antibiootikumide vastu resistentsus (Jing ja Yan, 2020). Eksperimendis kasutatud neomütsiin ja streptomütsiin kuuluvad just sinna rühma. Samas ei saa praeguses töös analüüsitud tulemuste põhjal väita, et see oli põhjuseks. Antibiootikume manustati hiirtele autoklaavitud vee kaudu, mille tarbimine oli *ad libitum*. Sellisel moel ei olnud otseselt kontrollitud antibiootikumi annuse kogus hiire kohta (Reikvam *et al.*, 2011). Antibiootikumide lisamine vette võib selle maitset muuta, mistõttu võivad hiired vee joomist vältida (Hill *et al.*, 2010; Reikvam *et al.*, 2011; Zákostelská *et al.*, 2016). Nii ei pruukinud hiired tarbida piisaval hulgal antibiootikume ja osad bakterid hiire mikroobioomist võisid jääda alles.

Inimese proovisegusid saanud hiirtes oli märgatavalt tõusnud perekondade *Blautia*, *Bacteroides* ja *Parabacteroides* hulk, mis olid esindatud ka inimese proovisegudes. Töötlemata

hiirte proovides jäi kõikide loetletud perekondade hulk alla 1%-i. Ka varasemalt on kirjeldatud, et perekond *Bacteroides* koloniseerib FMTi läbinud hiireliini C57BL6/J edukalt (Zhou *et al.*, 2019). Erinevate bakteriperekondade ülekandumise efektiivsus sõltub keskkonnast, milles bakterid on harjunud olema ja nende võimetest kohanemiseks (Janzen, 1985). Hiire ja inimese seedekulgla pH on teatud määral erinev (vt Joonis 3) ja see muutus mõjutab ka ülekantavaid baktereid (Fallingborg, 1999; McConnell *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2002; Sofi *et al.*, 2014). Perekond *Blautia* tuleb rasketes tingimustes toime tänu mitmetele geenidele, mis aitavad ületada keskkonnast tulenevat stressi (sh vastupidav muutuva pH, hapnikutaseme, temperatuuri ja soolsuse tingimustes) (Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020; Y. Zhang *et al.*, 2017). Ka perekond *Parabacteroides* esindajad moodustavad biofilmi, mis aitab samuti hakkama saada muutuvate keskkonningimustega (Wang *et al.*, 2019).

Fekaalse transplantatsiooniga ei kandunud hiirtele üle mõlemas inimese proovisegus olev perekond *Faecalibacterium*. Selle perekonna esindaja *F. prausnitzii* on väga tundlik erinevatele keskkonnamuutustele. Bakteri optimaalne kasvukeskkond on pH = 5,7–6,7 juures, tolereerib ka, kui pH = 5–5,7, kuid pH = 3,5–4,5 juures kasvu ei ole (Foditsch *et al.*, 2014; Lopez-Siles *et al.*, 2012). Hiire jämesoole pH = 4,4–5,0 ja võib seega mõjutada bakteri kasvu ja hulka (McConnell *et al.*, 2008). Lisaks on *F. prausnitzii* auksotroofne osade vitamiinide ja kofaktorite suhtes, mida ei pruukinud näiteks esineda fekaaltransplantatsiooni saanud hiirtes (Heinken *et al.*, 2014). Samas ei piisa praegustest analüüsides järelduste tegemiseks bakteriliigi tasemel. Varasemalt on perekond *Faecalibacterium* olnud hiirtes olemas pärast korduvat FMTi metsiktüüpi hiirtega (Wrzosek *et al.*, 2018). Selles töös läbiviidud eksperimendi raames kanti FMTi teel inimese mikrobiomi korduvalt üle antibiootikumikuuri läbinud hiirtele, mis võib mõjutada selle bakteriperekonna ülekannet hiirtele. Esimesest inimese proovisegust (FMT1) ei kandunud fekaaltransplantatsiooni teel üle ka bakteriperekond *Prevotella*. See perekond on inimestel tavaliselt laialdaselt levinud, ent ka varasem uuring on näidanud, et hiirtesse *Prevotella* üle ei kandu. Selles uuringus toodi välja, et hiire seedekulgla ei pruugi olla soodsaid tingimusi selle perekonna kasvuks (Hildebrand *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2019). Antibiootikumide teel mikroobivabaks tehtud hiirtele kandub inimese mikrobiota FMTi teel üle 57–68%-i ulatuses (Hintze *et al.*, 2014). See selgitab, miks ei olnud selles eksperimendis inimese ja FMTi läbinud hiirte mikrobiota sarnasus üks ühele. Hiir\_FMT1 proovidest leiti 64,6%-i ulatuses samu bakteriperekondi, mis olid olemas FMT1-l ja hiir\_FMT2 proovidest vastavalt 60,9%-i ulatuses, mida leiti ka FMT2 segudest.

Mikrobiomi uurimine on keeruline, sest seda mõjutavad väga paljud erinevad tegurid (Round ja Mazmanian, 2009). Selles eksperimendis võisid saadud tulemusi mõjutada näiteks

inimese ja hiire füsioloogilised, toitumuslikud, elustiililised ja -keskkonnast tingitud erinevused. Eksperimendi faasis võivad mikrobioomile mõju avaldada proovide kogumise, säilitamise ja vahepealse käitlemise viisid. Hiirte puhul võib olulist rolli mängida nende omavaheline kokkupuude vivaariumis, kontaminatsioon ja iga vaheetapi õnnestumise edukus. Lisaks sellele avaldab mõju ka analüüsitud 16S rRNA geeni piirkonna valimine ning analüüsiks valitud meetodid. Tehtud eksperimendi põhjal saab öelda, et antibiootikumikuuri ja fekaalse transplantatsiooni läbinud hiirte ja töötlemata hiirte mikrobiomivahelised erinevused olid üldiselt suuremad võrreldes inimese proovisegude ja FMTi saanud hiirtega. Samas leidis igas grupis bakteriperekondi, mis saadud tulemuste järgi inimese proovisegust hiirtele üle ei kandunud või mis olid olemas nii töötlemata kui FMTi läbinud hiirtel, kuid puudusid inimese proovisegudest. Laiapõhjaliste järelduste tegemiseks oleks vaja teha veel põhjalikumaid analüüse. Üheks variandiks on metagenoomi analüüs, et näha, kas fekaalse siirdamise saanud hiirtesse algsetest hiirtest alles jäänud bakteritel on olemas resistentsusgeenid või võis tegu olla genoomse jäägiga. Veel saaks sel teel tuvastada mikroobikoosluses esinevaid baktereid liigi ja tüve tasandil. Metagenoomse analüüsiga saab tuvastada lisaks bakteritele ka seente, viiruste ja algloomade kooslusi, et näha, kuidas need hiirde üle kanduvad. Lisaks sellele annaks parema ülevaate rohkemate loomade kaasamine katsesse. Teist liiki katseloomade, näiteks roti kasutamisel saaks teha võrdlevaid analüüse ja näha, milline mudel annab kõige rohkem informatsiooni inimese mikrobioomi kohta. Sealjuures tuleks lähtuda William Russeli ja Rex Bruchi sõnastatud kolme R-i reeglist (ingl *the 3Rs*), mis soovib võimaluse korral loomkatseid asendada, vähendada ja täiustada (Russell ja Burch, 1959). Viimane tähendab seda, et kasutamise korral tuleb katseplaan hästi läbi mõelda, et kätte saaks võimalikult palju analüüsiks vajalikku informatsiooni.

## KOKKUVÕTE

Inimese mikrobiomi all mõistetakse mikroorganismide kooslust kindlas kehapiirkonnas. Mikroobikoosluse ja inimese tervise vahel on leitud mitmeid seoseid, mispärast on selle uurimine ja analüüsimine olulise tähtsusega. Mikrobiomi mõjutavad väga mitmed tegurid, mis teeb selle uurimise keeruliseks. Ühe uurimismeetodina kasutatakse loomudeleid, sest neid on erinevalt inimesest võimalik hoida kontrollitud keskkonnas ja tingimustes. Fekaalse transplantatsiooni (*fecal microbiota transplantation* – FMT) teel sisestatakse katselooma inimese mikroobikoosluse segu ja analüüsitakse nähtud tulemusi. Sealjuures on üheks levinuimaks katseloomaks hiir. Hiirte abil on leitud mitmeid seoseid erinevate haiguste ja mikroobikoosluse vahel, kuid vähe on uuritud hiire informatiivsust inimese mikrobiomi uurimisel.

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks oli analüüsida inimeste soolestiku mikroobikoosluse ülekandumise edukust hiirtele, kasutades selleks eesti geenidoonoritelt pärit väljaheiteproove. Bakterikooslus määrati 16S rRNA geeni V3–V4 piirkondade sekveneerimise teel. Uuringu käigus analüüsiti metsiktüüpi hiirte proove (n=16), inimese proovisegusid (n=2) ja antibiootikumikuuri ja fekaalse transplantatsiooni läbinud hiirte proove (n=16), millest pooltele siirdati üht ja pooltele teist inimese proovisegu.

Töö tulemustes nähti, et analüüsitud proovides olid sarnase esinemissagedusega hõimkondadeks *Bacillota* ja *Bacteroides*. Uuringus osalenud gruppide vahel leiti statistilisi erinevusi alfamitmekesisuses. Oluliselt erinev oli mitmekesisus metsiktüüpi hiirte ja esimest inimese proovisegu saanud hiirte vahel. Teist proovisegu saanud hiirte ja metsiktüüpi hiirte vahel esines oluline erinevus ainult vaadeldud perekondade vahel. Kahe fekaaltransplantatsiooni saanud hiiregrupi omavahelisel võrdlusel leiti oluline erinevus Shannoni mitmekesisuses. Beetamitmekesisuse uurimiseks koostatud peakomplektanalüüs näitas proovide klasterdumist samasse gruppi kuulumise alusel. Bakteriperekondade suhtelisi sagedusi analüüsides oli näha, et fekaaltransplantatsiooni saanud hiirtel esines bakteriperekondi, mis puudusid metsiktüüpi hiirtes, kuid olid olemas inimese proovisegudes näiteks *Phascolarctobacterium*. Samas esines inimese proovisegudes perekondi, mida üheski hiirte proovides ei tuvastatud, nt *Agathobacter*. Sellest saab järeldada, et fekaalse mikrobiota siirdamine inimeselt hiirele on toimunud, kuid see ülekanne pole olnud ideaalne. Täpsemate järelduste tegemiseks oleks vaja läbi viia metagenoomne analüüs, mis võimaldab analüüsida ka bakteriliikide ja -tüvede ülekannet ning tuvastada ka mükrobiomi, viroomi, algloomade bioomi ja arhesid.

## RESÜMEE / SUMMARY

### Using mouse model to study the human gut microbiome

Claudia Maria Ruhno

#### Summary

The human microbiome is described as a colony of microorganisms in a specific area of the body. The microbiome is influenced by numerous factors, making it challenging to study. Animal models are often used as a study technique since they can be maintained in controlled settings. Through fecal microbiota transplantation (FMT), a variety of human microbes are transferred into an experimental animal. The mouse is the experimental animal used most frequently. Despite the fact that mice have been used to discover a number of connections between the microbiome and a variety of diseases, little is known how informative mice actually are.

The aim of this thesis was to look into the effectiveness of fecal transplantation in mice using stool samples from gene donors in the Estonian Biobank. The samples' V3–V4 16S rRNA gene regions were sequenced for analysis. Samples of wild-type mice (n=16), human sample mixtures (n=2), and samples of mice that got a course of antibiotics and fecal microbiota transplantation (n=16) from either of the human sample mixtures were all studied.

The results of this bachelor's thesis indicated that both of the genera *Bacteroides* and *Bacillota* were present in all the samples examined. Wild-type mice had significantly lower alpha diversity compared to the mice who received the first human sample mixture. The mice getting the second mixture had significantly higher number of observed genera compared to the wild-type mice. Comparing the two FMT groups a significant difference in Shannon diversity was discovered. Principal component analysis (PCA) demonstrated sample clustering based on their group. The mice who underwent fecal transplantation were found to have bacterial genera that were lacking in wild-type mice but prevalent in human sample mixtures, such as *Phascolarcobacterium*. However, there were genera in the human sample mixtures which were not discovered in any of the mouse samples, such as *Agathobacter*. To sum it up fecal microbiota transplantation occurred, however this transfer was not flawless. To draw more precise conclusions, a shotgun metagenomics which also enables the study of mycobiome, virome, protozoan biome and archaea could be done.

## TÄNUSÕNAD

Soovin südamest tänada oma juhendajaid Kertu Liis Krigulit ja Elin Orgi, kelle põhjalik tagasiside ja püsiv toetus aitas väga kaasa lõputöö kirjutamisele ja valmimisele. Veel tänan genoomika instituudi mikrobiomika töögrupi magistranti Linda Sootaku, kes oli abiks laboritöö, bioinformaatiliste ja statistiliste analüüsidega. Lisaks sellele tahan tänada kogu genoomika instituudi mikrobiomi uurimisgruppi, molekulaar- ja rakubioloogia instituudi biotehnoloogia ja Umeå ülikooli labori liikmeid, kelle tehtud töö aitas kaasa eksperimentaalse osa valmimisele.

## KIRJANDUSE LOETELU

Aasmets, O., Krigul, K.L., Lüll, K., Metspalu, A., Org, E. (2022). Gut metagenome associations with extensive digital health data in a volunteer-based Estonian microbiome cohort. *Nature Communications* 13, 869.

Abt, M.C., McKenney, P.T., Pamer, E.G. (2016). *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature Reviews Microbiology* 14, 609–620.

Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., ... Artis, D. (2012). Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity* 37, 158–170.

Agriculture, U.S.D. (2003). Profiling food consumption in America. *Agriculture Fact Book*.

Ali, A.H., Hale, T.W., Khasawneh, F.A., Urban, R.S., Werner, H.V., Smalligan, R.D. (2013). NISIN and *Clostridium difficile*: A Potentially Effective Treatment for an Increasingly Problematic Disease. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG* 108, 625.

Ames, N.J., Ranucci, A., Moriyama, B., Wallen, G.R. (2017). The human microbiome and understanding the 16S rRNA gene in translational nursing science. *Nursing research* 66, 184.

Antonoplis, A., Zang, X., Wegner, T., Wender, P.A., Cegelski, L. (2019). Vancomycin–arginine conjugate inhibits growth of carbapenem-resistant *E. coli* and targets cell-wall synthesis. *ACS chemical biology* 14, 2065–2070.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature* 473, 174–180.

Aslam, S., Hamill, R.J., Musher, D.M. (2005). Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *The Lancet infectious diseases* 5, 549–557.

Aw, W., Fukuda, S. (2018). Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus. *Journal of diabetes investigation* 9, 5–12.

Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 979–984.

- Badran, M., Khalyfa, A., Ericsson, A.C., Puech, C., McAdams, Z., Bender, S.B., Gozal, D. (2023). Gut microbiota mediate vascular dysfunction in a murine model of sleep apnoea: effect of probiotics. *European Respiratory Journal* 61.
- Bakken, J.S., Borody, T., Brandt, L.J., ... Fecal Microbiota Transplantation Workgroup. (2011). Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical gastroenterology and hepatology* 9, 1044–1049.
- Baldrige, M.T., Nice, T.J., McCune, B.T., Yokoyama, C.C., Kambal, A., Wheadon, M., Diamond, M.S., Ivanova, Y., Artyomov, M., Virgin, H.W. (2015). Commensal microbes and interferon- $\lambda$  determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science* 347, 266–269.
- Baquero, F., Levin, B.R. (2021). Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 19, 123–132.
- Barb, J.J., Oler, A.J., Kim, H.-S., Chalmers, N., Wallen, G.R., Cashion, A., Munson, P.J., Ames, N.J. (2016). Development of an analysis pipeline characterizing multiple hypervariable regions of 16S rRNA using mock samples. *PLoS One* 11, e0148047.
- Barcena, C., Valdés-Mas, R., Mayoral, P., ... López-Otín, C. (2019). Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nature medicine* 25, 1234–1242.
- Barko, P., McMichael, M., Swanson, K.S., Williams, D.A. (2018). The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine* 32, 9–25.
- Bayer, F., Ascher, S., Pontarollo, G., Reinhardt, C. (2019). Antibiotic treatment protocols and germ-free mouse models in vascular research. *Frontiers in immunology* 10, 2174.
- Bokoliya, S.C., Dorsett, Y., Panier, H., Zhou, Y. (2021). Procedures for fecal microbiota transplantation in murine microbiome studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 868.
- Bosco, N., Noti, M. (2021). The aging gut microbiome and its impact on host immunity. *Genes & Immunity* 22, 289–303.
- Bouma, G., Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews immunology* 3, 521–533.

- Burz, S.D., Abraham, A.-L., Fonseca, F., ... Juste, C. (2019). A guide for ex vivo handling and storage of stool samples intended for fecal microbiota transplantation. *Scientific reports* 9, 8897.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 13, 581–583.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Costello, E.K., ... Knight, R. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome biology* 12, 1–8.
- Chen, D., Wu, J., Jin, D., Wang, B., Cao, H. (2019). Fecal microbiota transplantation in cancer management: Current status and perspectives. *International journal of cancer* 145, 2021–2031.
- Chen, K., Neimark, H., Rumore, P., Steinman, C.R. (1989). Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS microbiology letters* 57, 19–24.
- Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J.A., ... Kasper, D.L. (2012). Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 149, 1578–1593.
- Claesson, M.J., Cusack, S., O’Sullivan, O., ... O’Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4586–4591.
- Clarke, G., Stilling, R.M., Kennedy, P.J., Stanton, C., Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2014). Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Molecular endocrinology* 28, 1221–1238.
- Cooper, S., Mathews, R., Bushar, L., Paddock, B., Wood, J., Tammara, R. (2019). The Human Microbiome: Composition and Change Reflecting Health and Disease. *HAPS Educator* 23, 432–445.
- Corbitt, N., Kimura, S., Isse, K., Specht, S., Chedwick, L., Rosborough, B.R., Lunz, J.G., Murase, N., Yokota, S., Demetris, A.J. (2013). Gut bacteria drive Kupffer cell expansion via MAMP-mediated ICAM-1 induction on sinusoidal endothelium and influence preservation-reperfusion injury after orthotopic liver transplantation. *The American journal of pathology* 182, 180–191.

- Costea, P.I., Hildebrand, F., Arumugam, M., ... Bork, P. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature microbiology* 3, 8–16.
- Cummings, J.H., Beatty, E.R., Kingman, S.M., Bingham, S.A., Englyst, H.N. (1996). Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *British Journal of Nutrition* 75, 733–747.
- De Groot, P.F., Frissen, M., De Clercq, N., Nieuwdorp, M. (2017). Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future. *Gut microbes* 8, 253–267.
- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Martinez, F.J., Huffnagle, G.B. (2016). The microbiome and the respiratory tract. *Annual review of physiology* 78, 481–504.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 11971–11975.
- Dubourg, G., Lagier, J.-C., Armougom, F., Robert, C., Audoly, G., Papazian, L., Raoult, D. (2013). High-level colonisation of the human gut by Verrucomicrobia following broad-spectrum antibiotic treatment. *International journal of antimicrobial agents* 41, 149–155.
- Dubourg, G., Lagier, J.C., Robert, C., ... Raoult, D. (2014). Culturomics and pyrosequencing evidence of the reduction in gut microbiota diversity in patients with broad-spectrum antibiotics. *International journal of antimicrobial agents* 44, 117–124.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science* 308, 1635–1638.
- Ekmekciu, I., Von Klitzing, E., Fiebiger, U., Escher, U., Neumann, C., Bacher, P., Scheffold, A., Kühl, A.A., Bereswill, S., Heimesaat, M.M. (2017). Immune responses to broad-spectrum antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. *Frontiers in immunology* 8, 397.
- Ellekilde, M., Selfjord, E., Larsen, C.S., ... Hansen, C.H.F. (2014). Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Scientific reports* 4, 5922.

Emal, D., Rampanelli, E., Stroo, I., Butter, L.M., Teske, G.J., Claessen, N., Stokman, G., Florquin, S., Leemans, J.C., Dessing, M.C. (2017). Depletion of gut microbiota protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 28, 1450–1461.

Ericsson, A.C., Crim, M.J., Franklin, C.L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri medicine* 110, 201.

Ernst, P.B., Carvunis, A.-R. (2018). Of mice, men and immunity: a case for evolutionary systems biology. *Nature immunology* 19, 421–425.

Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin* 46, 183–196.

Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology* 10, 226.

Foditsch, C., Santos, T.M., Teixeira, A.G., Pereira, R.V., Dias, J.M., Gaeta, N., Bicalho, R.C. (2014). Isolation and characterization of *Faecalibacterium prausnitzii* from calves and piglets. *PloS one* 9, e116465.

Fontaine, C.A., Skorupski, A.M., Vowles, C.J., Anderson, N.E., Poe, S.A., Eaton, K.A. (2015). How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. *Gut Microbes* 6, 225–233.

Foster, H.L. (1959). Housing of disease-free vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences* 78, 80–88.

Frank, D.N., Pace, N.R. (2008). Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current opinion in gastroenterology* 24, 4–10.

Franklin, C.L., Ericsson, A.C. (2017). Microbiota and reproducibility of rodent models. *Lab animal* 46, 114–122.

Fuentes, S., de Vos, W.M. (2016). How to manipulate the microbiota: fecal microbiota transplantation. *Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease* 143–153.

Gerke, H. (2014). Whats the lowdown on “fecal transplantation.” *Health at Iowa. U of Iowa.*

Ghoshal, N., Bal, H. (1989). Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory animals* 23, 21–29.

Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A., De Vos, P. (2013). The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PloS one* 8, e71360.

Goodrich, J.K., Waters, J.L., Poole, A.C., ... Ley, R.E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799.

Grasa, L., Abecia, L., Forcén, R., Castro, M., de Jalón, J.A.G., Latorre, E., Alcalde, A.I., Murillo, M.D. (2015). Antibiotic-induced depletion of murine microbiota induces mild inflammation and changes in toll-like receptor patterns and intestinal motility. *Microbial ecology* 70, 835–848.

Gustafsson, J.K., Ermund, A., Johansson, M.E., Schütte, A., Hansson, G.C., Sjövall, H. (2012). An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 302, G430–G438.

Haas, L. (1999). Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 67, 578–578.

Hansen, C., Krych, L., Nielsen, D., Vogensen, F., Hansen, L., Sørensen, S., Buschard, K., Hansen, A. (2012). Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia* 55, 2285–2294.

Hartstra, A.V., Bouter, K.E., Bäckhed, F., Nieuwdorp, M. (2015). Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes care* 38, 159–165.

Heinken, A., Khan, M.T., Paglia, G., Rodionov, D.A., Harmsen, H.J., Thiele, I. (2014). Functional metabolic map of *Faecalibacterium prausnitzii*, a beneficial human gut microbe. *Journal of bacteriology* 196, 3289–3302.

Hickman, D., Johnson, J., Vemulapalli, T., Crisler, J., Shepherd, R. (2017). Commonly used animal models. *Principles of animal research for graduate and undergraduate students* 117.

Hildebrand, F., Nguyen, T.L.A., Brinkman, B., Yunta, R.G., Cauwe, B., Vandenabeele, P., Liston, A., Raes, J. (2013). Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-

individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome biology* 14, 1–15.

Hill, D.A., Hoffmann, C., Abt, M.C., Du, Y., Kobuley, D., Kirn, T.J., Bushman, F.D., Artis, D. (2010). Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal immunology* 3, 148–158.

Hintze, K.J., Cox, J.E., Rompato, G., Benninghoff, A.D., Ward, R.E., Broadbent, J., Lefevre, M. (2014). Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut microbes* 5, 183–191.

Hrncir, T., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC immunology* 9, 1–11.

Hugenholtz, F., de Vos, W.M. (2018). Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, 149–160.

Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS one* 5, e9836.

Janzen, D.H. (1985). On ecological fitting.

Jensen, M.N., Ritskes-Hoitinga, M. (2007). How isoflavone levels in common rodent diets can interfere with the value of animal models and with experimental results. *Laboratory animals* 41, 1–18.

Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., Jansson, J.K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal* 1, 56–66.

Jing, R., Yan, Y. (2020). Metagenomic analysis reveals antibiotic resistance genes in the bovine rumen. *Microbial Pathogenesis* 149, 104350.

Kapoor, P., Kumari, A., Sheoran, B., Sharma, S., Kaur, S., Bhunia, R.K., Rajarammohan, S., Bishnoi, M., Kondepudi, K.K., Garg, M. (2022). Anthocyanin biofortified colored wheat modifies gut microbiota in mice. *Journal of Cereal Science* 103433.

- Kardos, N., Demain, A.L. (2011). Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied microbiology and biotechnology* 92, 677–687.
- Kelly, C.J., Zheng, L., Campbell, E.L., ... Colgan, S.P. (2015). Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell host & microbe* 17, 662–671.
- Kennedy, E.A., King, K.Y., Baldrige, M.T. (2018). Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. *Frontiers in physiology* 9, 1534.
- Knight, R., Callewaert, C., Marotz, C., Hyde, E.R., Debelius, J.W., McDonald, D., Sogin, M.L. (2017). The microbiome and human biology. *Annual review of genomics and human genetics* 18, 65–86.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8, 423–435.
- Kozul, C.D., Nomikos, A.P., Hampton, T.H., Warnke, L.A., Gosse, J.A., Davey, J.C., Thorpe, J.E., Jackson, B.P., Ihnat, M.A., Hamilton, J.W. (2008). Laboratory diet profoundly alters gene expression and confounds genomic analysis in mouse liver and lung. *Chemico-biological interactions* 173, 129–140.
- Krogh, A. (1929). The progress of physiology. *Science* 70, 200–204.
- Krych, L., Hansen, C.H., Hansen, A.K., van den Berg, F.W., Nielsen, D.S. (2013). Quantitatively different, yet qualitatively alike: a meta-analysis of the mouse core gut microbiome with a view towards the human gut microbiome. *PloS one* 8, e62578.
- Kurilshikov, A., Medina-Gomez, C., Bacigalupe, R., ... Zhernakova, A. (2021). Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. *Nature genetics* 53, 156–165.
- Kuss, S.K., Best, G.T., Etheredge, C.A., Pruijssers, A.J., Frierson, J.M., Hooper, L.V., Dermody, T.S., Pfeiffer, J.K. (2011). Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science* 334, 249–252.
- La Reau, A.J., Suen, G. (2018). The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. *Journal of microbiology* 56, 199–208.

- Lagier, J.-C., Khelaifia, S., Alou, M.T., ... Raoult, D. (2016). Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature microbiology* 1.
- Lagkouvardos, I., Lesker, T.R., Hitch, T.C., ... Clavel, T. (2019). Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. *Microbiome* 7, 1–15.
- Lane, N. (2015). The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677)‘Concerning little animals.’ *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370, 20140344.
- Lee, J., Purello, C., Booth, S.L., Bennett, B., Wiley, C.D., Korstanje, R. (2023). Chow diet in mouse aging studies: nothing regular about it. *GeroScience* 1–6.
- Lee, P., Yacyshyn, B.R., Yacyshyn, M.B. (2019). Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT). *Diabetes, Obesity and Metabolism* 21, 479–490.
- Lewin, R.A. (2009). *Merde: excursions in scientific, cultural, and socio-historical coprology*. Random House.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., ... Gordon, J.I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *science* 320, 1647–1651.
- Li, F., Feng, Y., Liu, H., ... Dai, C. (2022). Gut microbiome and metabolome changes in mice with acute vestibular deficit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 260.
- Li, Q., Chen, Q., Ruan, H., Zhu, D., He, G. (2010). Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1340–1346.
- Lindgren, M., Löfmark, S., Edlund, C., Huovinen, P., Jalava, J. (2009). Prolonged impact of a one-week course of clindamycin on *Enterococcus* spp. in human normal microbiota. *Scandinavian journal of infectious diseases* 41, 215–219.
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & cell* 12, 315–330.

- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome medicine* 8, 1–11.
- Löfmark, S., Jernberg, C., Jansson, J.K., Edlund, C. (2006). Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 1160–1167.
- Lopez-Siles, M., Khan, T.M., Duncan, S.H., Harmsen, H.J., Garcia-Gil, L.J., Flint, H.J. (2012). Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Applied and environmental microbiology* 78, 420–428.
- Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature reviews microbiology* 12, 661–672.
- Lundberg, R. (2019). Humanizing the gut microbiota of mice: Opportunities and challenges. *Laboratory animals* 53, 244–251.
- Lundberg, R., Toft, M.F., August, B., Hansen, A.K., Hansen, C.H. (2016). Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut microbes* 7, 68–74.
- Macfarlane, G.T., Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International* 95, 50–60.
- Macpherson, A., McCoy, K. (2015). Standardised animal models of host microbial mutualism. *Mucosal immunology* 8, 476–486.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006). *Microorganisms and microbiology*. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey (NJ): Pearson Prentice Hall 1–20.
- Manca, C., Boubertakh, B., Leblanc, N., ... Silvestri, C. (2020). Germ-free mice exhibit profound gut microbiota-dependent alterations of intestinal endocannabinoidome signaling. *Journal of lipid research* 61, 70–85.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 9, 599–608.
- Masopust, D., Sivula, C.P., Jameson, S.C. (2017). Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *The Journal of Immunology* 199, 383–388.

McConnell, E.L., Basit, A.W., Murdan, S. (2008). Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60, 63–70.

Mullen, J. (2014). Multidrug Resistant Organisms (MDROs): What Are They. Department of Public Health.

Murphy, P.B., Bistas, K.G., Le, J.K. (2018). Clindamycin.

National Research Council., Board on Agriculture., Committee on Animal Nutrition., Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. (1995). Nutrient requirements of the mouse, in: *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995*. National Academies Press (US).

Nearing, J.T., Douglas, G.M., Comeau, A.M., Langille, M.G. (2018). Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ* 6, e5364.

Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease models & mechanisms* 8, 1–16.

Nicklas, W., Keubler, L., Bleich, A. (2015). Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. *ILAR journal* 56, 241–249.

Norman, J.M., Handley, S.A., Virgin, H.W. (2014). Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology* 146, 1459–1469.

Noverr, M.C., Noggle, R.M., Toews, G.B., Huffnagle, G.B. (2004). Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. *Infection and immunity* 72, 4996–5003.

O'Mahony, S.M., Marchesi, J.R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.-M., Quigley, E.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2009). Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological psychiatry* 65, 263–267.

Otten, H. (1986). Domagk and the development of the sulphonamides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 17, 689–690.

- Park, J., Kotani, T., Konno, T., ... Matozaki, T. (2016). Promotion of intestinal epithelial cell turnover by commensal bacteria: role of short-chain fatty acids. *PloS one* 11, e0156334.
- Park, J.C., Im, S.-H. (2020). Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Experimental & molecular medicine* 52, 1383–1396.
- Pellizzon, M.A., Ricci, M.R. (2018). The common use of improper control diets in diet-induced metabolic disease research confounds data interpretation: the fiber factor. *Nutrition & metabolism* 15, 1–6.
- Prescott, L.M., Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- Rajilić-Stojanović, M., De Vos, W.M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews* 38, 996–1047.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Rao, K., Safdar, N. (2016). Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Journal of hospital medicine* 11, 56–61.
- Reikvam, D.H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F.L., Gaustad, P., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Meza-Zepeda, L.A., Johansen, F.-E. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PloS one* 6, e17996.
- Reiss, A., Jacobi, M., Rusch, K., Andreas, S. (2016). Association of dietary type with fecal microbiota and short chain fatty acids in vegans and omnivores. *J. Int. Soc. Microbiota* 1, 1–9.
- Roager, H.M., Licht, T.R., Poulsen, S.K., Larsen, T.M., Bahl, M.I. (2014). Microbial enterotypes, inferred by the prevotella-to-bacteroides ratio, remained stable during a 6-month randomized controlled diet intervention with the new nordic diet. *Applied and environmental microbiology* 80, 1142–1149.
- Rodriguez, D.M., Benninghoff, A.D., Aardema, N.D., Phatak, S., Hintze, K.J. (2019). Basal diet determined long-term composition of the gut microbiome and mouse phenotype to a greater extent than fecal microbiome transfer from lean or obese human donors. *Nutrients* 11, 1630.

- Round, J.L., Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews immunology* 9, 313–323.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition* 57, 1–24.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Sakaguchi, E. (2003). Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal* 74, 327–337.
- Salzman, N.H., de Jong, H., Paterson, Y., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Bos, N.A. (2002). Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* 148, 3651–3660.
- Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell metabolism* 17, 225–235.
- Schären, O.P., Hapfelmeier, S. (2021). Robust microbe immune recognition in the intestinal mucosa. *Genes & Immunity* 22, 268–275.
- Schloss, P.D. (2021). Amplicon sequence variants artificially split bacterial genomes into separate clusters. *Msphere* 6, e00191-21.
- Schwarz, R., Kaspar, A., Seelig, J., Künnecke, B. (2002). Gastrointestinal transit times in mice and humans measured with <sup>27</sup>Al and <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* 48, 255–261.
- Shang, L., Tu, J., Dai, Z., Zeng, X., Qiao, S. (2022). Microbiota Transplantation in an Antibiotic-Induced Bacterial Depletion Mouse Model: Reproducible Establishment, Analysis, and Application. *Microorganisms* 10, 902.
- Shreiner, A.B., Kao, J.Y., Young, V.B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology* 31, 69.

- Smits, L.P., Bouter, K.E., De Vos, W.M., Borody, T.J., Nieuwdorp, M. (2013). Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* 145, 946–953.
- Sofi, M.H., Gudi, R., Karumuthil-Melethil, S., Perez, N., Johnson, B.M., Vasu, C. (2014). pH of drinking water influences the composition of gut microbiome and type 1 diabetes incidence. *Diabetes* 63, 632–644.
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E.L., Lynch, S.V. (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PloS one* 10, e0117617.
- Sudarikov, K., Tyakht, A., Alexeev, D. (2017). Methods for the metagenomic data visualization and analysis. *Current issues in molecular biology* 24, 37–58.
- Tan, J., Gong, J., Liu, F., Li, B., Li, Z., You, J., He, J., Wu, S. (2022). Evaluation of an antibiotic cocktail for fecal microbiota transplantation in mouse. *Frontiers in nutrition* 9.
- Tetro, J., Allen-Vercoe, E. (2016). *The human microbiome handbook*. DEStech Publications, Inc.
- Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249.
- Tremlett, H., Bauer, K.C., Appel-Cresswell, S., Finlay, B.B., Waubant, E. (2017). The gut microbiome in human neurological disease: a review. *Annals of neurology* 81, 369–382.
- Treuting, P.M., Dintzis, S., Montine, K.S. (2017). *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas*. Academic Press.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine* 1, 6ra14-6ra14.
- Ubeda, C., Taur, Y., Jenq, R.R., ... Pamer, E.G. (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *The Journal of clinical investigation* 120, 4332–4341.
- Ursell, L.K., Metcalf, J.L., Parfrey, L.W., Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition reviews* 70, S38–S44.

- Vincent, A.D., Wang, X.-Y., Parsons, S.P., Khan, W.I., Huizinga, J.D. (2018). Abnormal absorptive colonic motor activity in germ-free mice is rectified by butyrate, an effect possibly mediated by mucosal serotonin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 315, G896–G907.
- Wacklin, P., Tuimala, J., Nikkilä, J., ... Mättö, J. (2014). Faecal microbiota composition in adults is associated with the FUT2 gene determining the secretor status. *PloS one* 9, e94863.
- Wang, D., Hao, Z., Zhao, J., Jin, Y., Huang, J., Zhou, R., Wu, C. (2019). Comparative physiological and transcriptomic analyses reveal salt tolerance mechanisms of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Process Biochemistry* 82, 59–67.
- Wong, M.-W., Yi, C.-H., Liu, T.-T., Lei, W.-Y., Hung, J.-S., Lin, C.-L., Lin, S.-Z., Chen, C.-L. (2018). Impact of vegan diets on gut microbiota: An update on the clinical implications. *Tzu-Chi Medical Journal* 30, 200.
- Wos-Oxley, M.L., Bleich, A., Oxley, A.P., ... Pieper, D.H. (2012). Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. *Gut microbes* 3, 234–249.
- Wrzosek, L., Ciocan, D., Borentain, P., Spatz, M., Puchois, V., Hugot, C., Ferrere, G., Mayeur, C., Perlemuter, G., Cassard, A.-M. (2018). Transplantation of human microbiota into conventional mice durably reshapes the gut microbiota. *Scientific reports* 8, 1–9.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., ... Lewis, J.D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108.
- Xu, X., Wang, Z., Zhang, X. (2015). The human microbiota associated with overall health. *Critical reviews in biotechnology* 35, 129–140.
- Yan, J., Herzog, J.W., Tsang, K., Brennan, C.A., Bower, M.A., Garrett, W.S., Sartor, B.R., Aliprantis, A.O., Charles, J.F. (2016). Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E7554–E7563.
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., ... Gordon, J.I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature* 486, 222–227.
- Yi, P., Li, L. (2012). The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Veterinary microbiology* 157, 1–7.

- Zákostelská, Z., Málková, J., Klimešová, K., ... Kverka, M. (2016). Intestinal microbiota promotes psoriasis-like skin inflammation by enhancing Th17 response. *PloS one* 11, e0159539.
- Zhang, L., Bahl, M.I., Roager, H.M., Fonvig, C.E., Hellgren, L.I., Frandsen, H.L., Pedersen, O., Holm, J.-C., Hansen, T., Licht, T.R. (2017). Environmental spread of microbes impacts the development of metabolic phenotypes in mice transplanted with microbial communities from humans. *The ISME journal* 11, 676–690.
- Zhang, W., Wang, Y., Li, K., Kwok, L.-Y., Liu, W., Zhang, H. (2020). Modulation of fatty acid metabolism improves oxygen tolerance of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Probio-M8. *Journal of dairy science* 103, 8791–8795.
- Zhang, Y., Limaye, P.B., Renaud, H.J., Klaassen, C.D. (2014). Effect of various antibiotics on modulation of intestinal microbiota and bile acid profile in mice. *Toxicology and applied pharmacology* 277, 138–145.
- Zhang, Y., Xiao, Z., Zou, Q., Fang, J., Wang, Q., Yang, X., Gao, N. (2017). Ribosome profiling reveals genome-wide cellular translational regulation upon heat stress in *Escherichia coli*. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 15, 324–330.
- Zhao, L. (2013). The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nature Reviews Microbiology* 11, 639–647.
- Zheng, W., Tsompana, M., Ruscitto, A., Sharma, A., Genco, R., Sun, Y., Buck, M.J. (2015). An accurate and efficient experimental approach for characterization of the complex oral microbiota. *Microbiome* 3, 1–11.
- Zhou, W., Chow, K., Fleming, E., Oh, J. (2019). Selective colonization ability of human fecal microbes in different mouse gut environments. *The ISME Journal* 13, 805–823.
- Zimdahl, R.L. (2015). *Six chemicals that changed agriculture*. Academic Press.
- Zuo, P., Yu, P., Alvarez, P.J. (2021). Aminoglycosides antagonize bacteriophage proliferation, attenuating phage suppression of bacterial growth, biofilm formation, and antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e00468-21.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

NIH Human Genome Research Institute. Animal Model: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Animal-Model> (kasutatud 08.03.2023)

Maaeluministeerium. Loomkatsete korraldamine: <https://www.agri.ee/loomkatse-korraldamine> (kasutatud 18.03.2023)

## LISAD

### LISA 1. Väljaheiteproovide mõõdetud DNA kontsentratsioonid ja lugemite hulk

Proovi kood	Proovi grupp	DNA kontsentratsioon (ng/μl)	DNA lugemite arv
m900_BL	hiir_alg	59,5	122 557
m901_BL	hiir_alg	40,6	60 677
m902_BL	hiir_alg	47,1	84 468
m903_BL	hiir_alg	73,1	88 914
m904_BL	hiir_alg	111,3	101 907
m905_BL	hiir_alg	123,4	128 336
m906_BL	hiir_alg	61,9	103 570
m907_BL	hiir_alg	150,4	75 059
m909_BL	hiir_alg	106,4	77 258
m910_BL	hiir_alg	95,9	49 054
m911_BL	hiir_alg	173,3	125 711
m912_BL	hiir_alg	219,4	106 877
m916_BL	hiir_alg	123,1	95 662
m917_BL	hiir_alg	50,4	86 726
m918_BL	hiir_alg	88,6	70 535
m919_BL	hiir_alg	160,1	115 052
m900_DC	hiir_FMT1	256,6	118 550
m901_DC	hiir_FMT1	66,2	92 387
m902_DC	hiir_FMT1	110,5	102 192
m903_DC	hiir_FMT1	240,7	85 343
m904_PreSac	hiir_FMT1	437,4	107 049
m905_DC	hiir_FMT1	58,5	109 022
m906_DC	hiir_FMT1	91,2	112 680
m907_DC	hiir_FMT1	266,0	111 293
m909_DC	hiir_FMT2	47,3	100 033
m910_DC	hiir_FMT2	162,4	112 962
m911_DC	hiir_FMT2	121,2	82 659
m912_DC	hiir_FMT2	155,1	96 826
m916_PreSac	hiir_FMT2	131,8	107 155
m917_DC	hiir_FMT2	125,2	132 224
m918_DC	hiir_FMT2	179,5	111 083
m919_DC	hiir_FMT2	160,2	98 272
GrA_FMT_Mat	FMT1	24,1	100 049
GrB_FMT_Mat	FMT2	30,7	91 925

**LISA 2.** Suurima esinemissagedusega hõimkonnad ja perekonnad\* viie uuritava grupi vahel.

Proovitüüp	Hõimkond	Suhteline esinemissagedus	Perekond	Suhteline esinemissagedus
hiir_alg	<i>Bacteroidota</i>	51.21%	<i>Muribaculaceae</i> sugukonda kuuluv bakteriperekond	36.35%
	<i>Bacillota</i>	45.54%	<i>Lactobacillus</i>	20.92%
	<i>Pseudomonadota</i>	1.36%	<i>Muribaculaceae</i> sugukonda kuuluv bakteriperekond	7.68%
	<i>Deferribacteres</i>	1.01%	<i>Muribaculaceae</i> sugukonda kuuluv bakteriperekond	5.68%
FMT1			<i>Alistipes</i>	4.62%
			<i>Faecalibaculum</i>	3.54%
	<i>Bacillota</i>	56.35%	<i>Escherichia-Shigella</i>	8.67%
	<i>Bacteroidota</i>	23.79%	<i>Prevotella</i>	8.19%
	<i>Pseudomonadota</i>	8.93%	<i>Blautia</i>	7.71%
	<i>Actinomycetota</i>	8.78%	<i>Bacteroides</i>	6.09%
hiir_FMT1			<i>Bifidobacterium</i>	4.98%
			<i>Faecalibacterium</i>	4.47%
	<i>Bacteroidota</i>	52.98%	<i>Bacteroides</i>	35.19%
	<i>Bacillota</i>	37.52%	<i>Turicibacter</i>	10.01%
FMT2	<i>Pseudomonadota</i>	8.03%	<i>Parabacteroides</i>	8.22%
	<i>Actinomycetota</i>	0.59%	<i>Butyricimonas</i>	6.87%
			<i>Rhodospirillales</i> seltsi kuuluv sugukond	4.37%
			<i>Barnesiella</i>	4.06%
FMT2	<i>Bacillota</i>	59.48%	<i>Bacteroides</i>	29.62%
	<i>Bacteroidota</i>	32.24%	<i>Blautia</i>	10.08%
	<i>Actinomycetota</i>	5.41%	<i>Faecalibacterium</i>	5.72%
	<i>Verrucomicrobiota</i>	2.20%	<i>Holdemanella</i>	3.78%
hiir_FMT2			<i>Bifidobacterium</i>	3.40%
			<i>Fusicatenibacter</i>	3.32%
	<i>Bacteroidota</i>	52.22%	<i>Bacteroides</i>	43.26%
	<i>Bacillota</i>	30.19%	<i>Akkermansia</i>	10.66%
hiir_FMT2	<i>Verrucomicrobiota</i>	8.40%	<i>Parabacteroides</i>	9.25%
	<i>Pseudomonadota</i>	8.25%	<i>Parasutterella</i>	4.40%
			<i>Phascolarctobacterium</i>	2.83%
			<i>Lachnospiraceae</i> sugukonda kuuluv perekond	2.64%

\*Osad perekonnad pole olnud laboris kultiveeritud, mispärast on tabelis sugukonna/seltsi nimi.

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Claudia Maria Ruhno,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Hiiremudeli kasutamine inimese soolestiku mikrobioomi uurimiseks”, mille juhendajad on MSc Kertu Liis Krigul ja PhD Elin Org, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Claudia Maria Ruhno

29.05.2023