

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

**Soolestiku mikroobide vahendusel moodustuv metaboliit trimetüülamiin N-oksiid (TMAO)
ja selle seosed tervisenäitajatega Soome populatsioonis**

Magistritöö

30 EAP

Johana Koppel

Juhendaja

PhD Elin Org

TARTU 2018

Infoleht

Soolestiku mikroobide vahendusel moodustuv metaboliit trimetüülamiin N-oksiid (TMAO) ja selle seosed tervisenäitajatega Soome populatsioonis

Viimastel aastatel on üha rohkem tähelepanu pälvinud bakterite vahendatud ainevahetuse käigus moodustuv metaboliit TMAO, mida peetakse võimalikuks biomarkeriks südame-veresoonkonna, ainevahetus- ja neeruhaiguste tuvastamisel ning potentsiaalseks soolestiku mikrobioomile suunatud sihtmärgiks nende haiguste ravis. Siiski on selle mõju inimesele uuritud veel vähestes populatsioonides ning täpselt ei teata, milliste mikroobide vahendusel TMAO moodustub. Käesolevas töös uuritakse TMAO seost prediabeediga ning südame-veresoonkonna, ainevahetus- ja neeruhaigustele viitavate biomarkeritega Soomest kogutud valimis. Lisaks vaadeldakse TMAO seost soolestiku mikrobioomi mitmekesisuse ja selle kooslusega.

Märksõnad: Soolestiku mikrobioom, trimetüülamiin N-oksiid, TMAO

CERCS kood ja nimetus:

- B110 – Bioinformaatika, meditsiiniinformaatika, biomatemaatika, biomeetrika
- B230 – Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Gut bacteria derived metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) and its associations with health indicators in the Finnish population

In recent years the gut microbiome-dependent metabolite TMAO has gained a lot of attention as a possible biomarker because of its therapeutic potential in the prevention and treatment of cardio-metabolic and renal diseases. However, so far, the associations have been studied only in few populations and it is not precisely known, which microbes are essential in this pathway. This study focuses on the TMAO pathway associations with prediabetes and the biomarkers of cardio-metabolic and renal diseases in a Finnish cohort. In addition, it examines TMAO associations with gut microbiome diversity and community.

Keywords: Gut microbiome, trimethylamine N-oxide, TMAO

CERCS code and designation:

- B110 – Bioinformatics, medical informatics, biomathematics, biometrics
- B230 – Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
Kirjanduse ülevaade	7
1. Mikrobiom	7
2. Soolestiku mikrobiom	8
2.1. Soolestiku mikrobiomi kooslust mõjutavad faktorid	8
2.2. Soolestiku mikrobiomi mõju inimese tervisele	9
3. Trimetüülamiin N-oksiid (TMAO)	11
3.1. TMAO sünteesirada	11
3.2. TMAO seos haigustega	14
4. Meetodid inimese mikrobiomi uurimiseks	16
Ekspérimentaalne osa	21
1. Töö eesmärk	21
2. Materjal ja meetoodika	21
2.1. Valimi kirjeldus	21
2.2. Uuritavad metaboliidid ja biomarkerid	23
2.3. Prediabeedi ja diabeedi defineerimine	25
2.4. Mikrobiomi proovide ettevalmistus, sekveneerimine ja andmetöötlus	26
2.5. Metagenoomi ennustamine 16S rRNA andmetelt	27
2.6. Statistiline analüüs	27
3. Tulemused	29
3.1. γ -butürobetaini, koliini, L-karnitiini ja TMAO tasemete varieeruvus valimis	29
3.2. γ -butürobetaini, koliini, L-karnitiini ja TMAO seosed biomarkeritega	30
3.3. γ -butürobetaini, koliini, L-karnitiini ja TMAO seos prediabeediga	32
3.4. Soolestiku mikrobiomi kirjeldav analüüs	37
3.5. Alfa- ja beetamitmekesisuse erinevused kõrge ja madala TMAO puhul	39
3.6. γ -butürobetaini, koliini, L-karnitiini ja TMAO seosed soolestiku mikroobidega	40
3.7. <i>cutC/D</i> , <i>cntA/B</i> ja <i>yeaW/X</i> geeniklastrid METSIM-i valimi mikrobioomis	43
3.8. Soolestiku mikroobide ja preT2D koosmõju TMAO kontsentratsioonile	43
4. Arutelu	46

Kokkuvõte	51
Resume	52
Kasutatud kirjandus	54
Kasutatud veebilehed.....	63
Lisad	64

Kasutatud lühendid

γ BB – γ -butürobetaiin

CVD – südame-veresoonkonna haigused (ingl k *cardiovascular disease*)

FDR – statistiline meetod (ingl k *false discovery rate*)

FMO3 – flaviini sisaldav monoooksügenaasi ensüüm 3

GFR – glomerulaarfiltratsiooni tase (ingl k *glomerular filtration rate*)

GHbA1c – glükohemoglobiin

HDL – suure tihedusega lipoproteiin (ingl k *high density lipoprotein*)

hS-CRP – kõrge tundlikkusega C-reaktiivne valk (ingl k *high-sensitive C-reactive protein*)

inc. sed. – *Incertae sedis* ehk ebakindla paigutusega takson

KMI – kehamassiindeks

KO – KEGG *Orthology* andmebaas

LDL – madala tihedusega lipoproteiin (ingl k *low density lipoprotein*)

MAPK – mitogeeni aktiveeritav valgu kinaas (ingl k *mitogen-activated protein kinase*)

METSIM – andmestiku nimi (ingl k *Metabolic Syndrome in Men*)

NF- κ B – rakusisene signaalmolekul (ingl k *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

OR – šansisuhe (ingl k *odds ratio*)

OTU – sarnaseid järjestusi koondav operatiivne taksonoomiaühik (ingl k *operational taxonomic unit*)

preT2D – prediabeet (II tüüpi) ehk eeldiabeet

SCFA – lühikese ahelaga rasvhape (ingl k *short-chain fatty acid*)

SD – standardhälve (ingl k *standard deviation*)

SMAD3 – rakutsükli regulaator ja põhiline TGF β retseptori signaali edasikandja (ingl k *mothers against decapentaplegic homolog 3*)

T2D – II tüüpi diabeet (ingl k *type 2 diabetes*)

TGF β – rakuväline signaalmolekul, kasvaja kasvutegur β (ingl k *transforming growth factor beta*)

TMA – trimetüülamiin

TMAO – trimetüülamiin N-oksiid

Sissejuhatus

Viimastel aastakümnetel on leitud üha rohkem tõendeid, et inimese organism on tihedalt seotud tema keha pinnal ja sees elavate mikroorganismidega ehk mikrobiomiga. Igal inimesel on oma unikaalne mikrobiom, mis on inimeste vahel väga varieeruv. Organismi kõige mitmekesisem mikrobiom leidub soolestikus, mille stabiilne kooslus kaitseb organismi patogeenide eest, aitab kaasa immuunsüsteemi toimimisele ning lagundab inimesele seedimatuid ühendeid, mille käigus toodetakse olulisi signaalmolekule. Siiski on soolestiku mikrobiomi seostatud ka mitmete haiguste tekkimisega, mis on tihti tingitud muutustest toitumises, elustiilis või ravimite tarvitamisest.

Soolestiku mikrobiomi seos haigustega, nagu südame-veresoonkonna haigused ja ainevahetushäired, on juba pikalt olnud teada, kuid siiani ei ole selge, millised mehhanismid antud seost põhjustavad. Hiljuti on näidatud, et üheks võimalikuks vahendajaks võib olla mikroobide vahendatud ainevahetuse käigus moodustuv metaboliit, trimetüülamiin N-oksiid (TMAO). Selle metaboliidi kõrgeenenud kontsentratsiooni veres on siiani seostatud südame-veresoonkonna haiguste, ainevahetushäirete ja neeruprobleemide esinemisega nii hiirtel kui inimestel. TMAO on pälvinud suurt tähelepanu kui võimalik biomarker ja potentsiaalne soolestiku mikrobiomile suunatud sihtmärk nimetatud haiguste ennetamisel ning ravis.

TMAO mõju inimesele on siiani vaadeldud veel vähestes populatsioonides ning hetkel on puudulikud teadmised, millised mikroobid selle sünteesis osalevad. Käesoleva töö eesmärgiks on leida, kas varasemalt kirjanduses näidatud TMAO ja selle sünteesiraja seos südame-veresoonkonna, ainevahetus- ja neeruhaigustega on leitavad ka Soomest kogutud meeste valimis ning leida, millised mikroobid on olulised TMAO moodustumisel. Käesolev töö teostati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramus.

Kirjanduse ülevaade

1. Mikrobiom

Mikrobiom on hulkraksete organismide peal ja sees leiduv mikroorganismide kooslus. Mikroorganismide alla kuuluvad kõik viirused ja elusorganismid, mida on võimalik näha vaid mikroskoobiga ehk bakterid, arhed, mikroseedid ja muud ainuraksed.¹

Mikrobiomi olemasolust on teatud juba aastasadu, kuid suuremat tähelepanu pälvis see alles siis, kui töötati välja suure läbilaskevõimega sekveneerimistehnoloogiad. Viimaste aastate teadustööd on näidanud, et mikrobiom on tihedalt seotud organismi homöostaasiga ja omab suurt rolli arengus, ainevahetuses ning immuunsüsteemi välja kujunemises ja toimimises (Blander *et al.*, 2017; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2012; Turnbaugh *et al.*, 2006). Muutusi mikrobiomis on seostatud paljude erinevate haigustega, nagu soolehaigused (Carroll *et al.*, 2011; Dicksved *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2007), südame-veresoonkonna haigused (Tang ja Hazen, 2014; Yamashiro *et al.*, 2017), ainevahetushäired (Qin *et al.*, 2012; Turnbaugh *et al.*, 2006) ning isegi närvisüsteemiga seotud haigused (Hsiao *et al.*, 2013; Sampson *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016).

Viimastel aastatel on inimese mikrobiomi uuringud andnud palju uusi teadmisi. Varem arvati, et inimese genoom kodeerib kogu inimese fenotüüpi, kuid nüüdseks on teada, et inimese enda genoom moodustab vaid väikese osa inimese organismiga seotud geneetilisest mitmekesisusest. Kuigi inimese ja mikroobide rakkude arv organismis on ligikaudu võrdne (Sender *et al.*, 2016), ennustatakse, et kogu inimese mikrobiomi genoomis on 100 – 1000 korda rohkem geene võrreldes inimese enda genoomi geenide arvuga (Huttenhower *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2010; Turnbaugh *et al.*, 2007).

Mikrobiomi kooslus on populatsioonis väga varieeruv, samas kui inimese enda genoomi varieeruvus on vaid mõni protsent. Lisaks võib mikrobiomi kooslus erinevates keha piirkondades erineda suuresti. Kõige liigirikkama mikrobiomiga keha piirkonnad on suu ja soolestik. Kui suu mikrobiom on inimestel suhteliselt sarnane, siis soolestiku mikrobiom erineb inimeste vahel suuresti. Kõige liigivaesemad keha piirkonnad on aga nahk ja naise tupp. Naha mikrobiom erineb siiski suuresti inimeste vahel, kuid tupe mikrobiom on naistel suhteliselt sarnane. (Huttenhower *et al.*, 2012)

¹ <https://www.merriam-webster.com/>

2. Soolestiku mikrobiom

Inimese soolestikus on kõige liigirikkam mikrobiom, mille uurimine on viimastel aastatel väga kiiresti arenenud (Huttenhower *et al.*, 2012). Põhiline osa soolestiku mikrobiomi mitmekesisusest leidub jämesooles, kuhu jõuavad inimese jaoks lagundamatud toitained, mis on soolestiku mikroobidele elutegevuseks vajalikud ning mille fermenteerimisel saadud ühendid mõjutavad inimese organismi (Eckburg *et al.*, 2005).

Inimese soolestiku mikrobiom saab alguse ilmselt juba looteeas, kuid peale sündi, kui imik puutub kokku väliskeskkonnaga, hakkab mikrobiomi mitmekesisus kiiresti kasvama (Aagaard *et al.*, 2014; Girón de Velasco-Sada *et al.*, 2018). Esimese kolme eluaasta jooksul on soolestiku mikrobiomi kooslus väga muutuv, kuid seejärel kooslus stabiliseerub (Bäckhed *et al.*, 2015; Palmer *et al.*, 2007; Yatsunenko *et al.*, 2012). Kuigi mikrobiomi koosluses võivad toimuda kõikumised, püsib see suures plaanis stabiilsena, kui inimese elukeskkond, elustiil ja tervislik seisund ei muutu (Costello *et al.*, 2009; Dethlefsen ja Relman, 2011; Jakobsson *et al.*, 2010; Turnbaugh *et al.*, 2009; Yatsunenko *et al.*, 2012). On näidatud, et mikrobiomi kooslus muutub rohkem vanemas eas, kui inimese üleüldine vastupanu võime stressoritele ja haigusetekitajatele langeb (Franceschi *et al.*, 2000; Odamaki *et al.*, 2016).

Igal inimesel areneb välja temale unikaalne soolestiku mikrobiomi kooslus ning populatsioonis on see väga varieeruv. Siiski arvatakse, et täiskasvanute soolestikus võib leiduda tuumik mikrobiom (ingl k *core microbiome*) ehk mikroobid, mis on esindatud kõikide tervete täiskasvanud inimeste soolestikus, kuid siiani ei ole antud kontseptsioon päris selge. (Qin *et al.*, 2010; Tap *et al.*, 2009; Yatsunenko *et al.*, 2012)

2.1. Soolestiku mikrobiomi kooslust mõjutavad faktorid

Soolestiku mikrobiomi suurt varieeruvust põhjustab paljude erinevate faktorite koosmõju. Põhilisteks soolestiku mikrobiomi mõjutavateks faktoriteks on toitumine, elukeskkond, elustiil, vanus, sugu, ravimite tarvitamine ning inimese enda genoom (Quigley, 2013).

Genoomi mõju soolestiku mikrobiomile ei ole siiski veel päris selge. On leitud, et kaksikutel on sarnasem mikrobiomi kooslus kui mitte sugulastel ning ühemunaraku kaksikute mikrobiomi kooslus on sarnasem kui kahemunaraku kaksikutel. Siiski on näidatud, et sarnane elukeskkond on sarnasema mikrobiomi koosluse juures ilmselt olulisem kui geneetika. (Goodrich *et al.*, 2016; Rothschild *et al.*, 2018; Turnbaugh *et al.*, 2009)

Keskkonna faktoritest on üheks tähtsamaks soolestiku mikrobioomi koosluse mõjutajaks toitumine (Duncan *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2007; Tilg, 2010; Walker *et al.*, 2011). Inimese toidulaualt on näiteks kompleksed süsivesikud toiduks ka soolestikus elavatele mikroobidele, mis soodustab vastavate mikroobide suuremat arvukust. Näiteks on küttidel-korilastel (nt hatsade populatsioon Tansaaniast) ja arengumaa rahvastel, kes siiani tarbivad kõrge kiudainesisaldusega toitu, märksa mitmekesisem mikrobioom võrreldes inimestega, kes on tänapäevase lääneliku toitumisharjumusega (Schnorr *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 2017; Yatsunenko *et al.*, 2012). Mitmekesine soolestiku mikrobioom on aga oluline erinevate metaboliitide tootmiseks, mis reguleerivad nii inimese ainevahetust, immuunsüsteemi kujunemist kui ka närvisüsteemi (Blander *et al.*, 2017; De Vadder *et al.*, 2014; Zhang ja Davies, 2016).

Üheks oluliseks soolestiku mikrobioomi mõjutajaks on ka ravimid. Antibiootikumide ravikuur põhjustab langust soolestiku mikroobide mitmekesisuses ja arvukuses. Sellised muutused võivad püsida kuid ja isegi aastaid ning tihtipeale ei taastugi soolestiku mikrobioomi koostus täielikult. (Dethlefsen ja Relman, 2011; Dethlefsen *et al.*, 2008) Muutused mikrobioomis võivad soodustada aga selliste patogeensete bakterite levikut nagu *Clostridium difficile* ja *Staphylococcus aureus* (Song *et al.*, 2008; Young ja Schmidt, 2004). Pikaajaline ja sage antibiootikumide kasutamine võib viia ainevahetuse ning immuunsüsteemi talituse häirimiseni (Blander *et al.*, 2017; Turnbaugh *et al.*, 2009). Kuigi antibiootikumide mõju soolestiku mikrobioomile on siiani põhjalikult uuritud, on täheldatud ka muude ravimite mõju soolestiku mikrobioomi kooslusele. Hiljutises Nature artiklis leiti, et 24% inimese rakkudele suunatud ravimitest inhibeeris vähemalt ühe bakteriliigi kasvu ning langetas selle arvukust märkimisväärselt (Maier *et al.*, 2018).

2.2. Soolestiku mikrobioomi mõju inimese tervisele

Soolestiku mikrobioom on inimese tervisliku seisundiga tihedalt seotud. Kui mikrobioomi ja soolehaiguste vaheline seos on mõistetav (Carroll *et al.*, 2011; Dicksved *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2007), siis viimastel aastatel on leitud ka paljude muude haiguste puhul muutusi mikrobioomi mitmekesisuses ja koosluses. Südame-veresoonkonna haigustest on leitud seoseid mikrobioomiga ateroskleroosi ning isheemia tõve korral (Koren *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Yamashiro *et al.*, 2017) ning ainevahetushaigustest II tüüpi diabeedi ja rasvumise korral (Bäckhed *et al.*, 2004; Ley *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2012; Turnbaugh *et al.*, 2009). Hiljuti on suurt tähelepanu pälvinud ka mikrobioomi ja närvisüsteemi vahelised seosed. Tervete ja haigete vahelisi mikrobioomi koosluse

erinevusi on täheldatud näiteks selliste närvisüsteemiga seotud haiguste puhul nagu Parkinsoni tõbi, skisofreenia ning autism (Scheperjans *et al.*, 2015; Schwarz *et al.*, 2018; Son *et al.*, 2015).

Organismi üldise kaitsevõime tagamiseks on aga oluline mitmekesine ja stabiilne soolestiku mikrobioomi kooslus, mis kaitseb organismi patogeenide eest, aitab kaasa immuunsüsteemi toimimisele ning tagab organismile oluliste signaalmolekulide olemasolu.

Soolestiku mikrobioomi geneetiline mitmekesisus on väga suur, mistõttu on soolestiku mikroobid võimelised lagundama ka selliseid ühendeid, mida inimese organism seedida ei suuda (Cummings *et al.*, 1987; Miller ja Wolin, 1996). Bakterid suudavad lagundada kiudaineid nagu tselluloos, mille tulemusel saab inimene taimsest toidust kätte oluliselt rohkem energiat (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2012; Sonnenburg *et al.*, 2005). Sellise kiudainete metabolismi tulemusel sünteesivad bakterid lühikese ahelaga rasvhappeid (ingl k *short-chain fatty acid*, SCFA), mis on olulisteks signaalmolekulideks ning aitavad imenduda paljudel mineraalidel nagu kaltsium, magneesium ja raud (Cummings, 1983; Miyazawa *et al.*, 1996; Younes *et al.*, 2001).

Lühikese ahelaga rasvhapetest on olulisemad äädikhape, propioonhape ja võihape. Need on olulised signaalmolekulid mitmes rakulises protsessis nagu geeniekspressioon, kemotaksis, diferentseerumine, rakkude jagunemine ning apoptoos. On leitud, et SCFA-d parandavad soolestiku tervislikku seisundit, suurendades inimese immuunsüsteemi kaitsevõimet, alandades põletikku ja inhibeerides vähi teket. (Ríos-Covián *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2014) Näiteks on äädihape, propioonhape ja võihape ligandideks G-valguga seotud retseptoritele nagu GPR43, GPR41 ja GPR109A (Brown *et al.*, 2003; Thangaraju *et al.*, 2009). Nimetatud retseptoreid leidub mitmete rakkude pinnal, kuid näiteks immuunrakkudel osalevad need immuunvastuse regulatsioonis (Kim *et al.*, 2013).

Lisaks lühikese ahelaga rasvhapetele moodustub soolestiku mikroobide elutegevuse käigus ka teisi inimese ainevahetust ja tervislikku seisundit mõjutavaid ühendeid. Bakterid sünteesivad näiteks trimetüülamiini (TMA), sekundaarseid sapphappeid, aminohappeid ning mitmeid vitamiine nagu vitamiin K, biotiin, foolhape ja riboflaviin (Jones *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2013; Sridharan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011). Sekundaarseid sapphappeid sünteesivad mikroobid maksas toodetud primaarsetest sapphapetest, mis ei imendu peensooles vaid jõuavad anaeroobsete bakteriteni jämesooles. Sekundaarsed sapphapped imenduvad verre, kus need käituvad signaalmolekulidena rasvhapete metabolismis. (Chiang, 2013; Hofmann ja Hagey, 2014)

Soolestiku mikrobiom on inimesele oluline ka kaitseks patogeenide eest. Kui inimese normaalne mikrobiom on hõivanud kogu soolestiku, siis ei ole patogeenidel ruumi ega toitaineid, et seal paljuneda ning soolestikku koloniseerida. Osad soolestiku bakterid võitlevad patogeenide vastu ka otseselt, tootes mitte-spetsiifilisi rasvhappeid ja peroksiide või spetsiifilisi bakteriotsiide, mis kahjustavad patogeene või on neile surmavad (Corr *et al.*, 2007; Rea *et al.*, 2010). Mõned soolestiku bakterid võivad toota ka proteaase, mis lagundavad patogeenide toodetud toksiine (Castagliuolo *et al.*, 1999).

3. Trimetüülamiin N-oksiid (TMAO)

Trimetüülamiin N-oksiid (TMAO) on metaboliit molekulmassiga 75,1 Da, mis tekib trimetüülamiini (TMA) oksüdeerumisel ². Seda metaboliiti on pikka aega teatud merebioloogias kui osmolüüti, mida mitmed veeloomad, näiteks kõhrkalad, kasutavad madala temperatuuri, kõrge soolsuse ja urea kaitseks (Yancey, 2005). Organismides, kes kasutavad TMAO-d osmolüüdina, aitab see säilitada valkude algset struktuuri ning ensüümide funktsionaalsust (Lin ja Timasheff, 1994; Yancey ja Siebenaller, 1999).

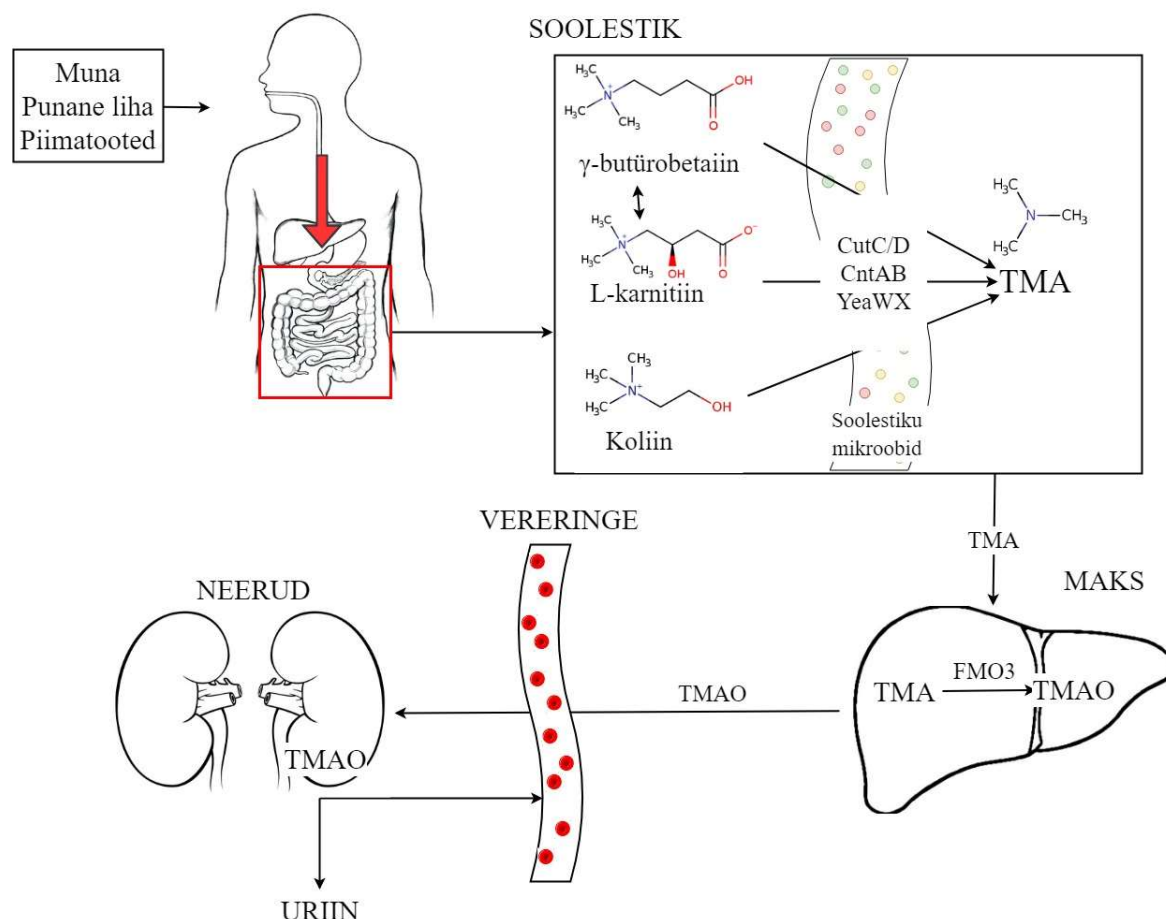
TMAO on saanud suuremat tähelepanu alates 2011. aastast, kui esmakordselt näidati selle seost inimesel südame-veresoonkonna haigustega. On teada, et TMAO tekib mikroobide vahendatud metabolismi käigus, kuid selle metaboliidi funktsiooni uurimine on veel pooleli. (Wang *et al.*, 2011)

3.1. TMAO sünteesirada

TMAO sünteesiraja lähteaineteks on koliin, L-karnitiin ja γ -butürobetaiin, mida inimene omastab põhiliselt punasest lihast, munast ja piimatoodetest. Nimetatud substraadid jõuavad toidu seedimisel soolestikku, kus soolestiku mikroobid kasutavad neid lähteainetena TMA sünteesimisel. (Koeth *et al.*, 2013, 2014; Wang *et al.*, 2011) Mikroobide elutegevuse käigus moodustuv TMA on gaasiline molekul, mis imendub kiiresti soolestikust vereringlusesse. Verega transportitakse TMA maksa, kus see oksüdeeritakse kiiresti TMAO-ks. (Anthoni *et al.*, 1991) TMA oksüdeerimist katalüüsivad inimese flaviini sisaldava monooksügenaasi perekonda kuuluvad ensüümid, eeskätt FMO3 (Bennett *et al.*, 2013). Mutatsioonid *FMO3* geenis

² National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID= 1145, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1145>

põhjustavad haigust nimega trimetüülaminiuria ehk kalalõhna sündroom. Muteerunud *FMO3* geeni tõttu TMA-d ei oksüdeerida, mistõttu eritub gaasiline kala aroomiga TMA hingamise, higi ja uriini kaudu. (Treacy *et al.*, 1998) Funktsionaalse *FMO3* valgu abil oksüdeeritakse TMA aga kiiresti TMAO-ks, mis suunatakse tagasi vereringlusesse, millest enamik suunatakse neerudesse, kus see eritub uriiniga (Tang *et al.*, 2015). TMAO sünteesirada inimese organismis kirjeldab kokkuvõtlikult joonis 1.



Joonis 1. TMAO sünteesirada inimese organismis. Muna, punase liha ja piimatoodete tarbimisel omastatakse γ -butürobetaini, L-karnitiini ja koliini. L-karnitiini sünteesitakse ka γ -butürobetaainist ning γ -butürobetaini saab sünteesida ka L-karnitiinist. Koliin, L-karnitiin ja γ -butürobetain on substraadiks soolestiku mikroobidele, kellel on olemas *cutC/D*, *cntA/B* või *yeaW/X* geeniklaster. Nimetatud lähteainete lagundamisel moodustub TMA, mis transporditakse maksa, kus see oksüdeeritakse *FMO3* ensüümi osalusel TMAO-ks. Maksast suunatakse TMAO vereringesse, mille kaudu jõuab see neerudesse, kus osa eritub organismist uriiniga ning osa suunatakse tagasi vereringesse.

TMAO sünteesiraja lähteained koliin, L-karnitiin ja γ -butürobetaiin on metüülamiini sisaldavad ühendid (Koeth *et al.*, 2013, 2014; Wang *et al.*, 2011). Koliin on B₄-vitamiin, mis on inimesele hädavajalik toitaine (Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, 1998). Koliin on oluline substraat rakumembraani komponentidele, osaledes metüülrühma ülekande reaktsioonides ning olles vajalik atsetüülkoliini kui olulise neurotransmitteri sünteesimiseks (Zeisel ja da Costa, 2009). Inimene omastab koliini põhiliselt toidust, kuid organism suudab seda vähesel määral ka ise maksas sünteesida (Vance *et al.*, 2007). Põhiliselt saab inimene koliini munast, maksast, maapähklitest ja piimatoodetest (Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, 1998).

L-karnitiini toodab inimese organism ise mitmeetapiliselt aminohappest lüsiin (Vaz ja Wanders, 2002). Samas omastab inimene L-karnitiini ka toiduga, nimelt leidub seda rohkesti punases lihas (Shimada *et al.*, 2004). Sarnaselt koliinile on ka L-karnitiin organismile vajalik, osaledes rasvhapete transpordil mitokondritesse (Bremer, 1983; Rebouche ja Seim, 1998). γ -butürobetaiin on mitmeetapilise L-karnitiini sünteesi viimane vaheühend (Rebouche ja Engel, 1980). L-karnitiini sünteesi γ -butürobetaiinist katalüüsib ensüüm γ -butürobetaiini dioksügenaas, mida leidub inimesel põhiliselt neerudes ning väiksemal hulgal ka maksas (Paul *et al.*, 1992; Vaz *et al.*, 1998). Kuigi eukarüootses rakus ei suudeta L-karnitiini edasi metaboliseerida, on leitud, et bakterite abil võib toimuda ka vastupidine reaktsioon, kus L-karnitiini konverteeritakse γ -butürobetaiiniks (joonis 1) (Rebouche ja Chenard, 1991; Rebouche ja Engel, 1980; Rebouche *et al.*, 1984; Seim *et al.*, 1985). Seega võivad TMAO raja substraadid olla üksteisega tihedalt seotud ning neid on võimalik üksteiseks konverteerida enne, kui need lülituvad edasistesse TMAO raja protsessidesse.

TMAO moodustumisel on olulisel kohal soolestiku mikroobid. Wang *et al.* näitasid, et TMAO moodustub vaid hiirtel, kellel on olemas soolestiku mikrobiom. Nii steriilsetel hiirtel kui ka antibiootikumi kuuri läbinud hiirtel TMAO-d ei moodustu. (al-Waiz *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2011) Soolestiku mikroobid kasutavad koliini, L-karnitiini ja γ -butürobetaiini süsinikuallikana ning nende lagundamisel eraldub TMA gaasilise jäätmena (Chen *et al.*, 2011). Nii hiirel kui inimesel on näidatud seoseid konkreetse mikroobi taksoni ja TMAO raja komponentide vahel (lisa 1).

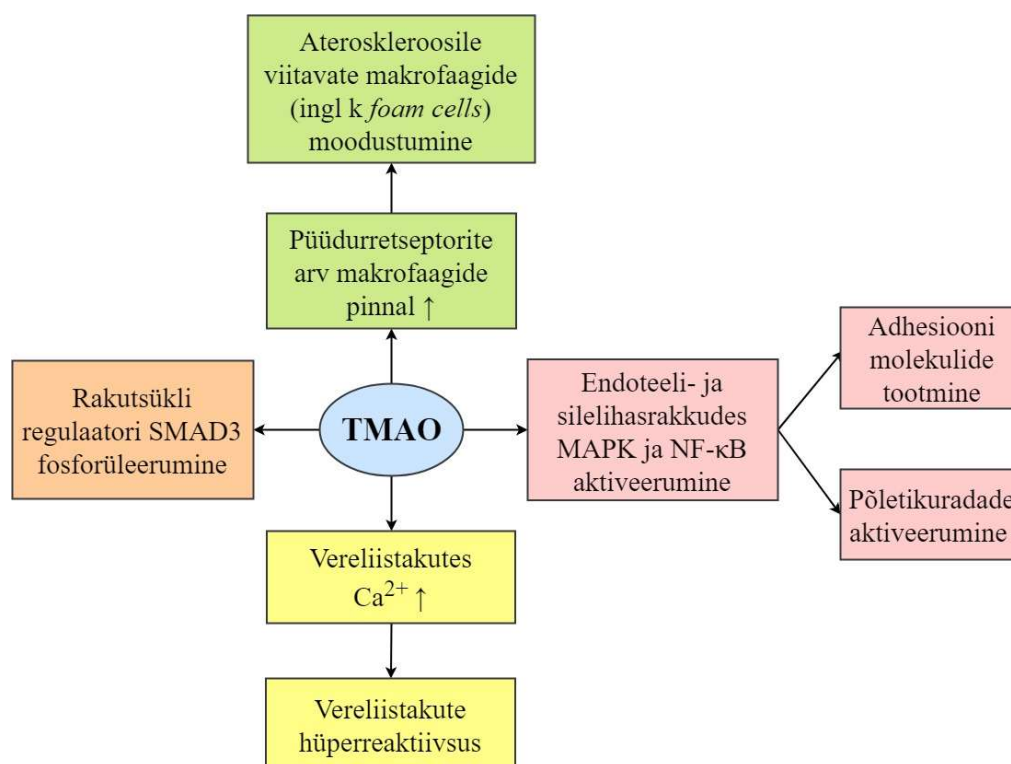
Soolestiku mikroobid on võimelised koliini, L-karnitiini ja γ -butürobetaiini lagundama ja TMA-d sünteesima vaid kindlate geeniklastrite olemasolul (joonis 1). Hetkel on teada kolm bakterite geeniklastrit, millelt kodeeritud valgud TMA sünteesis osalevad. Nendeks geeniklastriteks on *cutC/D*, *cntA/B*, *yeaW/Y*. Nimetatud geenidelt kodeeritavad valgud on vajalikud koliini, L-karnitiini või γ -butürobetaiini süsiniku ja lämmastiku vahelise sideme lõikamiseks, et moodustuks TMA. (Craciun ja Balskus, 2012; Koeth *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014) Ensüüm CutC ja teda aktiveeriv valk CutD on vajalikud koliini lagundamisel TMA-ks. *CutC/D* geeniklaster leiti esmalt lamba vatsast eraldatud bakteri *Desulfovibrio desulfuricans* genoomist, kuid selle homolooge leidub ka mitme inimese väljaheitest isoleeritud bakteri genoomis. Antud geeniklastrit või selle homoloogi on leitud näiteks bakteriperekondadest *Clostridium*, *Anaerococcus*, *Colinsella*, *Desulfitobacterium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* ja *Yokenella*. (Craciun ja Balskus, 2012) Oksügenaasse aktiivsusega valk CntA ja reduktaasse aktiivsusega valk CntB moodustavad ensüümi, mis on oluline karnitiini lagundamisel TMA-ks. Antud geeniklaster leiti esmalt bakterist *Acinetobacter baumannii*, kuid seda on leitud ka näiteks bakteriperekondadest *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Shigella* ja *Sporosarcina*. (Zhu *et al.*, 2014) Valgud YeaW ja YeaX on laiema lähteainete spektriga ning nende kaudu on võimalik lagundada nii koliini, L-karnitiini kui γ -butürobetaiini TMA-ks. (Koeth *et al.*, 2014)

3.2. TMAO seos haigustega

TMAO on pälvinud suurt tähelepanu alates 2011. aastast, kui leiti selle seos südame-veresoonkonna haigustega (ingl k *cardiovascular disease*, CVD) (Wang *et al.*, 2011). Wang *et al.* näitasid, et TMAO tase on märkimisväärselt kõrgem inimestel, kellel on esinenud südame-veresoonkonna haigusi nagu insult ja infarkt, võrreldes tervete inimestega. TMAO taseme määramine lubas ennustada südame-veresoonkonna haigustesse haigestumise riski. Hiirtel näidati, et TMAO soodustab püüdurretseptorite (ingl k *scavenger receptors*) teket makrofaagide pinnal ning seeläbi suurendab ka spetsiifiliste ateroskleroosile viitavate rakkude (ingl k *foam cells*) hulka, viies ateroskleroosi ehk arteri lubjastuse tekkeni. (Wang *et al.*, 2011) Ateroskleroos on südame-veresoonkonna põletikuline haiguslik seisund, mille tagajärjel arterid ahenevad ja jäigastuvad, põhjustades südameataki ja insuldi riski ³.

³ <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis>

Viimastel aastatel on leitud mitu uut mehhanismi, mille kaudu võib TMAO soodustada südame-veresoonkonna haiguste, nagu ateroskleroos, tromboos ja südamepuudulikkus, tekkimist (joonis 2). Lisaks makrofaagide pinnaretseptorite ekspressiooni suurenemisele on näidatud, et TMAO aktiveerib vereliistakutes rakusiseses Ca^{2+} vabastamise, mis viib vereliistakute hüperreaktiivsuseni. See aga põhjustab vereliistakute agregeerumist, mis suurendab riski trombide tekkeks. (Zhu *et al.*, 2016) Endoteeli- ja silelihasrakkudes on näidatud, et TMAO aktiveerib aga põletikurajad ja adhesioonimolekulide tootmise, indutseerides valgu kinaasi MAPK (ingl k *mitogen-activated protein kinase*) ja rakusiseses signaalmolekuli NF- κ B (ingl k *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) aktivatsiooni (Seldin *et al.*, 2016). Lisaks on leitud, et TMAO soodustab rakutsükli regulaatori SMAD3 fosforüleerimist, mis on põhiliseks TGF β (ingl k *transforming growth factor beta*) signaalraja efektormolekuliks (Tang *et al.*, 2015). On leitud, et TMAO signaliseerib rakku väga kiiresti, kuid siiani ei teata, milliste retseptorite kaudu antud signalisatsioon toimub (Seldin *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016).



Joonis 2. Mehhanismid, mille kaudu TMAO võib soodustada südame-veresoonkonna haiguste tekkimist.

Kõrgenenud TMAO taset seostatakse ka neeruhaigustega (Missailidis *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015). Samas on teada, et TMAO eritub kehast uriini kaudu, seega on veel selgusetu, kas neeruhaigustega kaasnev kõrgenenud TMAO tase tuleneb selle aktiivsemast sünteesimisest või väiksemast eritumisest neerudes. Kuigi täpset põhjuslikku seost neeruhaiguse ja TMAO taseme vahel ei ole suudetud näidata, on TMAO siiski paljulubav biomarker neeruhaigustele.

Soolestiku bakteritel on näidatud oluline seos metaboolsete haigustega nagu ülekaalulisus ja II tüüpi diabeet (ingl k *type 2 diabetes*, T2D) (Bäckhed *et al.*, 2004; Ley *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2012; Turnbaugh *et al.*, 2009). Kuna TMAO sünteesirada on tihedalt seotud soolestiku mikrobiomi kooslusega, siis on põhjust arvata, et ka TMAO või selle sünteesiraja komponendid võiksid olla seotud nimetatud metaboolsete haigustega. Hiljutistes töödes on õnnestunud ka näida, et TMAO kontsentratsioon vereplasmas on kõrgem II tüüpi diabeediga inimestel (Schugar *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017). Lisaks on leitud, et TMA oksüdeerimiseks olulise ensüümi FMO3 ekspressioonitase korreleerub positiivselt ülekaalulisusega (Schugar *et al.*, 2017). Siiski ei ole veel täpselt selge, milliste mehhanismide kaudu on TMAO ja selle sünteesiraja komponendid seotud metaboolsete haigustega.

4. Meetodid inimese mikrobiomi uurimiseks

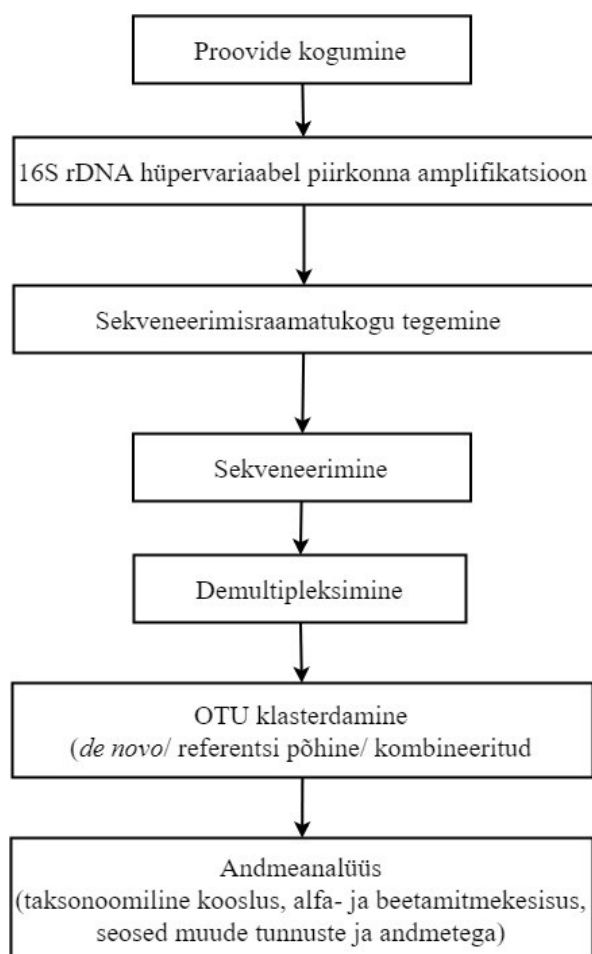
Organismide mikrobiomi olemasolust on teatud juba aastasadu. Inimese mikrobiomi mitmekesisuse uurimisele pani aluse Antonie van Leewenhoek 1680. aastatel, kui ta märkas erinevusi oma suu ja väljaheite mikroobide koosluses (Leewenhoek, 1684). Siiski jäi mikrobiom suurema tähelepanuta 2000. aastateni, kui töötati välja suure läbilaskevõimega teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad.

Algselt tähendas mikroorganismide uurimine nende kultiveerimist ning kirjeldamist kuju, suuruse ja värvuse järgi. Paljud organismide mikrobiomi, eriti soolestiku mikrobiomi, kuuluvad mikroorganismid ei ole aga lihtsasti kultiveeritavad ning nagu tänapäeval teatakse, võivad ka fülogeneetiliselt kauged mikroobid välja näha sarnased. Seepärast põhjustas sekveneerimine olulise hüppe ka mikroobide uurimises. (Pace, 1997; Pace *et al.*, 1986) Mikrobiom on aga rohkearvuline ning väga mitmekesine, mistõttu ei olnud Sangeri sekveneerimine selle uurimiseks piisavalt võimekas. Teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad on aga suurema läbilaskevõimega ning võrreldes Sangeri sekveneerimisega oluliselt kiiremad ja

odavamad, võimaldades viimasel aastakümnel hüppelist arengut mikrobioomi uurimises (Wetterstrand, 2016).

Tänapäevased suured mikrobioomi uuringud seisnevad uuritava valimi mikrobioomi proovide kogumises, mikroobide nukleotiidsete järjestuste sekveneerimises ning saadud nukleotiidsete järjestuste analüüsimises ja võrdlemises (Jovel *et al.*, 2016). Mikrobioomi uuringud jagunevad laias laastus kaheks, 16S rRNA geeni (rDNA) ja kogu genoomi (metagenoomika) analüüsiks. 16S rRNA uuringud võimaldavad uurida mikrobioomi bakterite ja arhede taksonoomilist kooslust. Metagenoomika uuringu käigus sekveneeritakse aga kõikide mikrobioomi kuuluvate organismide genoomide järjestus, mistõttu võimaldab see määrata, milliseid bakterite kodeeritud gene mikrobioomis esineb (Riesenfeld *et al.*, 2004).

Käesolevas töös on kasutatud 16S rRNA meetodit, mistõttu metagenoomika uuringuid pikemalt ei käsitleta. 16S rRNA uuringu üldist töövoogu kirjeldab joonis 3.



Joonis 3. 16S rRNA analüüsi üldine töövoog

16S rRNA uuringuteks sekveneeritakse DNA, millelt kodeeritakse bakterite ja arhede ribosoomi väikese subühiku 16S rRNA-d (Huttenhower *et al.*, 2012; Turnbaugh *et al.*, 2009; Yatsunenko *et al.*, 2012). 16S rRNA on aluseks tänapäevasele bakterite ja arhede klassifikatsioonile, mistõttu on selle abil võimalik bakterite taksonoomilist kooslust määrata (Woese, 1987). 16S rRNA on bakteritel ja arhedel kõrgelt konserveerunud, võimaldades disainida PCR amplifikatsiooniks universaalseid praimereid ning kergelt eristada bakterite ja arhede järjestusi inimese genoomsest järjestusest. 16S rRNA kõrgelt konserveerunud järjestuste vahel paikneb 9 kiiresti evolutsioneeruvat ehk hüpervariaabel piirkonda (V1 – V9), mis võimaldavad eristada baktereid ja arhesid liigi tasemel (Van de Peer *et al.*, 1996; Sogin *et al.*, 1972; Woese ja Fox, 1977). 16S rRNA meetod ei sobi aga eukarüootide ja viiruste uurimiseks, sest nendes 16S rRNA-d ei sünteesita.

16S rRNA geeni sekveneerimisele eelnevalt koostatakse nõ sekveneerimisraamatukogu. Raamatukogu moodustamiseks amplifitseeritakse üks või mitu hüpervariaabel piirkonda. Amplifitseeritavad piirkonnad valitakse sõltuvalt proovide päritolust, näiteks soolestiku mikroobide kirjeldamiseks kasutatakse enim piirkondi V2 – V3 ja V4, mis katavad võimalikult suure osa oodatavast mikroobsest mitmekesisusest. Amplifitseerimiseks kasutatavad praimerid disainitakse variaabel piirkondade vahel olevatele konserveerunud järjestustele. (Fouhy *et al.*, 2016) Peale sobiliku piirkonna amplifitseerimist kinnitatakse igale järjestusele vöötkood järjestus (ingl k *barcode sequence*) kirjeldamiseks, millisest proovist järjestus pärineb. Vöötkood järjestuse lisamine võimaldab erinevate inimeste proovide üheaegset sekveneerimist, mida nimetatakse järjestuste multipleksimiseks (ingl k *multiplexing*). (Hamady *et al.*, 2008) Peale vöötkoodide lisamist on sekveneerimisraamatukogu valmis, mis suunatakse sekveneerimisele.

Sekveneeritud järjestuste analüüsimiseks kasutatakse bioinformaatilisi meetodeid, mida hõlmavad populaarsemad mikrobioomi uurimiseks suunatud platvormid nagu QIIME (ingl k *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Caporaso *et al.*, 2010) ja mothur (Schloss *et al.*, 2009).

Sekveneerimise tulemuste analüüsimiseks sooritatakse esmalt demultipleksimine (ingl k *demultiplexing*), mis on vastupidine protsess sekveneerimisele eelnenud multipleksimisele. Demultipleksimise käigus omastatakse igale proovile sellele vastavad järjestused ning järjestust kirjeldavale nimetusele lisatakse selle proovi identifikaator, kust antud järjestus pärineb. Hilisema

töövoo hõlbustamiseks lõigatakse demultipleksimise käigus järjestuse küljest ära ka vöötkood järjestus ning selle amplifitseerimisel kasutatud praimerite järjestused. (Hamady *et al.*, 2008)

Järgmise etapina klasterdatakse järjestused operatiivseteks taksonoomiaühikuteks ehk OTU-deks (ingl k *Operational Taxonomic Unit*). Üks OTU hõlmab sarnaseid järjestusi, kus on teatud määr erinevust lubatud. Sagedasti loetakse ühte gruppi 97% ulatuses sarnased järjestused, mis on sarnane mikroobide geneetilisele erinevusele liigi tasandil. (McCaig *et al.*, 1999) OTU-de klasterdamisel lähtutakse kolmest järgmisest põhimõttest: *de novo*, referentsi põhine (ingl k *closed-reference*) ja kombineeritud (ingl k *open-reference*) klasterdamine. *De novo* OTU-de klasterdamine põhineb järjestuste omavahelisel joondamisel ning selleks ei kasutata referentsandmeid. Antud meetod on aga ajakulukas, mistõttu kasutatakse 16S rRNA uurimisel sagedasti kahte ülejäänud põhimõtet. Referentsi põhise meetodi puhul kasutatakse klasterdamiseks ainult referentsandmeid, mis 16S rRNA uurimisel pärinevad andmebaasidest, nagu *Greengenes* (DeSantis *et al.*, 2006), *SILVA* (Quast *et al.*, 2012) ja *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2014). Sellise põhimõttega klasterdatakse järjestused, mis referentsjärgestusega joonduvad, ülejäänud eemaldatakse aga väljundist ega kasutata edasises töövoos. Kombineeritud meetodi puhul klasterdatakse OTU-d esmalt referentsil põhinevat meetodit kasutades ning järjestustele, mida ei õnnestunud klasterdada, rakendatakse *de novo* meetodit. (Jovel *et al.*, 2016)

OTU-de klasterdamise tulemusel saadakse OTU tabel, mis sisaldab informatsiooni OTU gruppide ja nende sageduste kohta ning fülogeneetilist ja taksonoomilist informatsiooni. Saadud tabelit kasutatakse edasi mikrobioomi taksonoomilise mitmekesisuse analüüsimisel.

Mitmekesisuse hindamisel kasutatakse kahte parameetrit. Ühel juhul hinnatakse mitmekesisust lokaalselt, ühe objekti raames ja seda nimetatakse alfamitmekesisuseks (ingl k *alpha diversity*). Teisel juhul hinnatakse aga erinevate proovide vahelist mitmekesisust ja seda nimetatakse beetamitmekesisuseks (ingl k *beta diversity*). Kui alfamitmekesisuse objektiks on mingi keha piirkond, siis võib beetamitmekesisuse objektiks olla näiteks kõik kehapiirkonnad. Kui alfamitmekesisuse objektiks on üks vaatlusalune, siis beetamitmekesisuse objektiks võib olla kõik valimis olevad indiviidid. (Whittaker, 1972)

Mitmekesisuse mõiste koosneb samuti kahest osast, rikkus (ingl. k *richness*) ja arvukus (ingl. k *abundance*) või ühtlus (ingl. k *evenness*). Mikrobioomi rikkuse mõõduks loetakse seda, kui palju erinevaid mikroobirühmi leidub mikrobioomis, vaadeldes ühte taksonoomilist tasandit

nagu liik või perekond. Siin ei ole oluline kui palju mikroobe igas rühmas leidub. Arvukus ja ühtlus väljendavad aga seda kui palju mikroobe igasse rühma kuulub ning, kas erinevates rühmades on mikroobide arvukus sarnane. (Hill, 1973)

Eksperimentaalne osa

1. Töö eesmärk

TMAO on bakterite vahendatud ainevahetuse käigus moodustuv metaboliit, mida on varasemalt seostatud südame-veresoonkonna haigustega, ainevahetushäiretega ja neeruprobleemidega. TMAO on uus võimalik biomarker nimetatud haiguste ennetamisel, kuid selle mõju inimesele on hetkel vaadeldud vähestes populatsioonides. Sellest tulenevalt on käesoleva töö esimeseks eesmärgiks leida, kas ka Soome populatsioonis on TMAO või selle sünteesiraja lähteaineid seotud tunnustega, mis viitavad südame-veresoonkonna haigustele, neeruhaigustele ning ainevahetushaigustele nagu II tüüpi diabeet ja rasvumine.

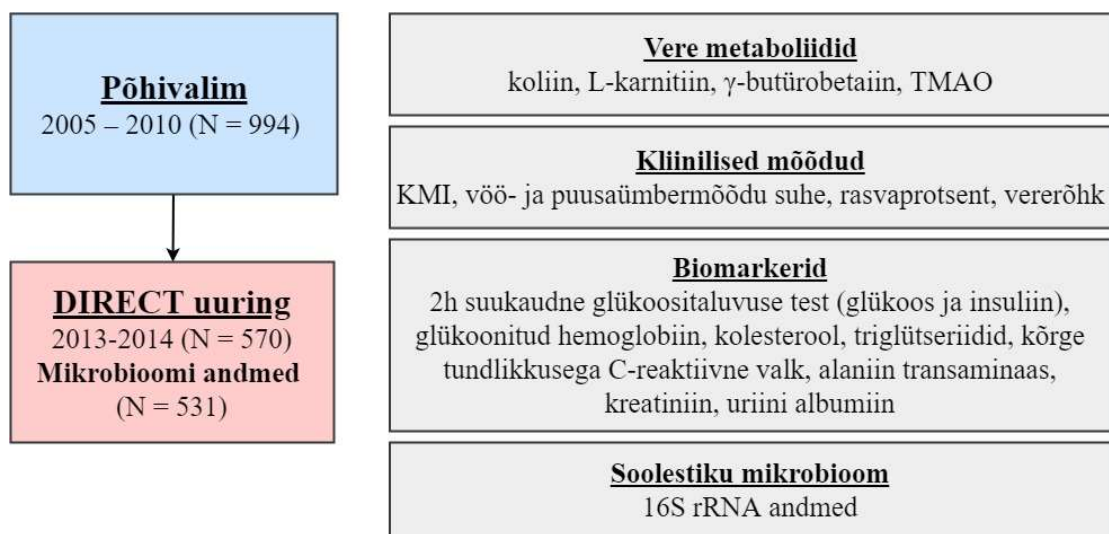
TMAO moodustumises osalevad soolestiku mikroobid, millest tulenevalt on käesoleva töö teiseks eesmärgiks leida, millised antud populatsioonis esinevad soolestiku mikroobid võivad olla TMAO sünteesirajas olulised.

2. Materjal ja meetodika

2.1. Valimi kirjeldus

Käesoleva töö valim pärineb METSIM-i (ingl k *Metabolic Syndrome in Men*) andmestikust (Laakso *et al.*, 2017). METSIM-i andmestik on loodud uurimaks II tüüpi diabeedi ja südame-veresoonkonna haiguste sõltuvust geneetilistest ja mittegeneetilistest faktoritest. Valim on kogutud aastatel 2005-2010 ning koosneb kokku 10 197 Soome mehest (vanuses 45–73 aastat). Uuritavad on valitud juhuslikult Kuopio linna rahvastiku registrist.

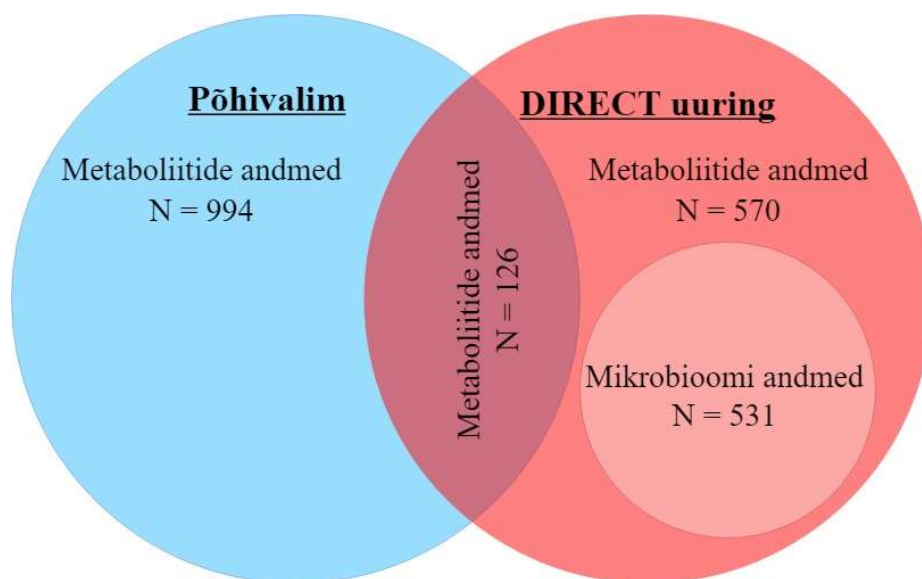
METSIM-i valimi põhilandmestik koosneb DNA ja RNA geneetilistest andmetest ning põhjalikest fenotüübi andmetest. Käesolevas töös on kasutatud järgnevaid andmeid: vere seerumist määratud metaboliidid, kliinilised kehamõõdud, vereplasmast ja -seerumist määratud biomarkerid, haigusfenotüübid ja soolestiku mikrobiom (joonis 4 ja tabel 1).



Joonis 4. Käesolevas töös kasutatud valim ja andmed. Töös on kasutatud andmeid TMAO sünteesiraja metaboliitide, kliiniliste mõõtude ja erinevate biomarkerite kohta, mis pärinevad põhivalimist ja DIRECT uuringust ning soolestiku mikrobioomi kohta, mis pärinevad DIRECT uuringust.

METSIM-i andmestiku puhul on tegemist longitudinaal uuringuga, kus uuritavad on pärast algset uuringut tagasi kutsutud ning neilt on teises ajapunktis kogutud uued proovid ja andmed. Käesolevas töös on kasutatud andmeid põhivalimist ning DIRECT uuringust, mis viidi läbi 2013 – 2014. aastal ehk 7 aastat pärast põhivalimi kogumise algust. DIRECT uuringu käigus koguti ka väljaheite proovid, kust määrati soolestiku mikrobioomi koosseis. Põhiandmestikust on kasutatud 994 inimese ning DIRECT uuringust 570 inimese andmeid, kellel on mõõdetud vereplasmast koliini, L-karnitiini, γ -butürobetaini ja TMAO kontsentratsioon. Kahe ajapunkti peale kattuvad 126 inimese andmed, seega on kokku kasutatud 1438 inimese andmeid. DIRECT uuringu andmetest on 531 inimesel kogutud ka mikrobioomi andmed. Käesolevas töös kasutatud ajapunktid ja vastavad andmehulgad on visualiseeritud joonisel 5.

Uuringu läbiviimiseks on saadud luba Kuopio Ülikooli Eetikakomiteelt ning kõik uuritavad on andnud kirjaliku nõusoleku proovide ja andmete kasutamiseks.



Joonis 5. Käesolevas töös kasutatud ajapunktid ning nendest pärinevate andmete hulk. Metaboliitide andmeid kasutati põhivalimist ning DIRECT uuringust (kokku N = 1438). Põhivalimis oli uuritavate arv 994 ning DIRECT valimis 570, kellest 126 inimesel olid olemas andmed mõlemas ajapunktis. DIRECT valimi 570 inimesest olid 531-l olemas ka soolestiku mikrobioomi andmed.

2.2. Uuritavad metaboliidid ja biomarkerid

Kõikidelt METSIM-i andmestiku uuritavatelt on kogutud 12 tunni paastu vereproov, mis külmutati -80 °C juures. Paastu vereproovi võtmisele järgnes suukaudse glükoositaluvuse test. Vereplasmast on mõõdetud käesolevas töös uuritavate metaboliitide (TMAO, koliin, L-karnitiin, γ -butürobetaiin) ning järgmiste biomarkerite kontsentratsioon: paastu glükoos ja insuliin, glükoos ja insuliin kaks tundi peale 75 g suhkru manustamist ning kõrge tundlikkusega C-reaktiivne valk. Vereseerumist on mõõdetud kolesterooli (üldkolesterool, LDL ja HDL), triglütseriidide ja kreatiniini kontsentratsioon. Käesolevas töös vaadeldud biomarkereid kirjeldab tabel 1.

Käesolevas töös analüüsitud metaboliidid (TMAO, koliin, L-karnitiin, γ -butürobetaiin) määrati LC-MS/MS (ingl k *stable isotope dilution liquid chromatography with on-line tandem mass spectrometry*) meetodil Cleveland kliinikus Prof. Stanley Hazeni laboris vastavalt eelnevalt kirjeldatule (Wang *et al.*, 2011) Käesolevas töös analüüsitud biomarkerid mõõdeti Kuopio Ülikooli Kliinikumis vastavalt eelnevalt kirjeldatule (Org *et al.*, 2017).

Tabel 1. Töös analüüsitud tunnuste ja biomarkerite kirjeldused.

Nimetus (ühik)	Lühend	Keskmine (SD) (N = 1438)	Mõju fenotüübile
Rasvaprotsent (%)	Rasva %	22,30 (6,01)	Kõrge näit viitab rasvumisele.
Kehamassiindeks	KMI	26,93 (3,57)	Kõrge näit viitab ülekaalulisusele.
Vöö- ja puusaümbermõõdu suhe	WHR	0,97 (0,06)	Kõrge näit viitab suurele rasva hulgale vöö piirkonnas ning ülekaalulisusele.
Glükohemoglobiin (%)	GHbA1c	5,63 (0,36)	Kõrge näit viitab diabeedi riskile.
Glükoosi kontsentratsioon paastu veres (mmol/l)	Glc0	5,77 (0,57)	Kõrge näit viitab diabeedi riskile.
Glükoosi kontsentratsioon 120 min pärast suhkru tarbimist (mmol/l)	Glc120	6,01 (2,07)	Suukaudse glükoositaluvuse testi tulemus. Kõrge näit viitab diabeedi riskile.
Insuliini kontsentratsioon paastu veres (mU/l)	Ins0	8,25 (5,59)	Kõrge näit viitab diabeedi riskile.
Insuliini kontsentratsioon 120 min pärast suhkru tarbimist (mU/l)	Ins120	45,73 (45,86)	Suukaudse glükoositaluvuse testi ajal mõõdetud tulemus. Kõrge näit viitab diabeedi riskile.
Matsuda indeks (mg/dl, mU/l)	Matsuda	7,49 (4,34)	Insuliini tundlikkuse indeks, arvatud suukaudse glükoositaluvuse testi tulemuste põhjal (Matsuda ja DeFronzo, 1999). Madal näit viitab insuliini resistentsusele ja diabeedi riskile.
Üldkolesterooli kontsentratsioon (mmol/l)	Üldkolesterool	5,51 (0,91)	Kõrge näit viitab südame-veresoonkonna haiguste riskile.
LDL kolesterooli kontsentratsioon (mmol/l)	LDL	3,50 (0,79)	Kõrge näit viitab südame-veresoonkonna haiguste riskile.
HDL kolesterooli kontsentratsioon (mmol/l)	HDL	1,49 (0,39)	Madal näit viitab südame-veresoonkonna haiguste riskile.
Triglütseriidide kontsentratsioon (mmol/l)	TG	1,38 (0,87)	Kõrge näit viitab südame-veresoonkonna haiguste riskile.

Tabel 1 jätk. Töös analüüsitud tunnuste ja biomarkerite kirjeldused.

Nimetus (ühik)	Lühend	Keskmine (SD) (N = 1438)	Mõju fenotüübile
hS-CRP (kõrge tundlikkusega reaktiivne kontsentratsioon (mg/l)) (C-alk)	CRP	1,84 (3,54)	Kõrge näit viitab südame-veresoonkonna haiguste riskile.
Kreatiniini kontsentratsioon (µmol/l)	Kreatiniin	82,04 (9,82)	Võimaldab hinnata neerude korrasolekut. Kõrge näit viitab neeruprobleemidele.
Glomerulaarfiltratsiooni kiirus	GFR	0,09 (0,01)	Arvutud järgmise valemiga: $32,788 * (S_Krea^{-1.154}) * (age^{-0.203})$ Võimaldab hinnata neerude korrasolekut. Madal näit viitab neeruprobleemidele.
Süstoolne vererõhk (mmHg)	Süstoolne VR	132,56 (14,35)	Esitatud kolme mõõtmistulemuse keskmine. Madal viitab hüpotensioonile ja kõrge näit hüpertensioonile.
Diastoolne vererõhk (mmHg)	Diastoolne VR	85,69 (8,80)	Esitatud kolme mõõtmistulemuse keskmine. Madal viitab hüpotensioonile ja kõrge näit hüpertensioonile.

2.3. Prediabeedi ja diabeedi defineerimine

II tüüpi diabeet ja sellele eelnev häire ehk prediabeet on METSIM-i valimis defineeritud suukaudse glükoositaluvuse testi põhjal, mille käigus mõõdeti uuritavate glükoosi kontsentratsioon vereplasmast enne suhkru manustamist (vähemalt 12h paastumine) ning kaks tundi peale 75 g suhkru manustamist. Prediabeet ja diabeet on defineeritud inimestel, kelle paastuglükoosi, 2h glükoosi või glükohemoglobiini tase vastab Ameerika Diabeediassotsiatsiooni (ADA 2010) kehtestatud kriteeriumile, mis on esitatud tabelis 2 (American Diabetes Association, 2014).

Tabel 2. Prediabeedile ja diabeedile vastavad paastuglukoosi, 2h glükoosi ja glükohemoglobiini tasemed.

Verenäitaja	Prediabeet	Diabeet
Paastuglukoos (mmol/l)	5,6 – 6,9	≥ 7,0
2h glükoos (mmol/l)	7,8 – 11,0	≥ 11,1
GHbA1c (%)	5,7 – 6,4	≥ 6,5

2.4. Mikrobioomi proovide ettevalmistus, sekveneerimine ja andmetöötlus

Mikroobse DNA eraldamist, proovide ettevalmistust ja sekveneerimist on kirjeldatud varasemalt (Org *et al.*, 2017). Kokkuvõtvalt eraldati mikroobide DNA 531 väljaheite proovist, mis koguti kliinikumis ja koheselt külmutati -80 °C juures. Eraldatud mikroobsest DNA-st amplifitseeriti 16S rRNA geeni V4 hüpervariaabel piirkond praimerite paariga 515F/806R. Amplifitseeritud DNA sekveneeriti Illumina MiSeq sekvenaatoriga Kalifornia Los Angelese Ülikooli (UCLA) genotüpiseerimise tuumiklaboris. Sekveneerimisel saadi kokku 12 571 075 järjestust (keskmiselt 23 674 järjestust inimese kohta).

16S rRNA geeni järjestuste töötlemiseks, kvaliteedikontrolliks, OTU-de klasterdamiseks ja OTU tabeli filtreerimiseks kasutati vabavaralist platvormi QIIME (versioon 1.9.1) (Caporaso *et al.*, 2010). Järjestused klasterdati OTU-desse identsusprotsendiga 97%, kasutades UCLUST algoritmi (Edgar, 2010) referentsipõhiselt (ingl k *closed-reference*) (Kreete Lüll avaldamata andmed). Kõikides analüüsid, välja arvatud PICRUST (ingl k *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) analüüsis kasutati referentsjärjestustena SILVA andmebaasi (versioon 119) (Quast *et al.*, 2012). PICRUST analüüsi puhul kasutati Greengenes andmebaasi (versioon 13.8) (McDonald *et al.*, 2012). Harva esinevate OTU-de välja filtreerimiseks mitmekesisuse ja korrelatsiooni analüüsid kasutati QIIME funktsiooni „*filter_samples_from_otu_table*“ ning alles jäeti OTU-d, mida esines vähemalt pooltel indiviididest (parameeter -s 265). Mikroobide taksonoomiline kooslus määrati igal taksoni tasemel kasutades QIIME funktsiooni „*summarize_taxa*“.

2.5. Metagenoomi ennustamine 16S rRNA andmetelt

Mikroobide geeniperekondade ja nende funktsiooni ennustamiseks 16S rRNA andmetelt kasutati programmi PICRUSt (Langille *et al.*, 2013). PICRUSt on vabavaraline programm, mis arvutuslikult ennustab markergeeni põhjal metagenoomi ehk, millised geenid mikroobioomis esinevad, kasutades selleks referentsandmebaasi. PICRUSt programmi kasutati vaikeparameetritega ning referentsandmebaasina kasutati KEGG Orthology (KO) andmebaasi (Kanehisa ja Goto, 2000; Kanehisa *et al.*, 2016, 2017). PICRUSt programmi väljundfailiks on sagedustabel, mis kirjeldab vastava KO koodiga geeni sagedust vastava indiviidi mikroobioomis.

2.6. Statistiline analüüs

Võimalike mõõtmisvigade vältimiseks eemaldati kõikidest statistilistest analüüsides γ -butürobetaini, koliini, L-karnitiini ja TMAO väärtused, mis olid keskmisest suuremad või väiksemad kui viiekordne standardhälve.

Korrelatsiooni arvutamisel kasutati vabavaralist statistikatarkvara R funktsiooni „*bicorAndPvalue*“ paketist *WGCNA* (Langfelder ja Horvath, 2012). Antud funktsioon arvutab kahepoolse keskmiste korrelatsiooni (ingl k *biweight midcorrelation*) ning iga korrelatsiooni puhul vastava *Student* t-testi väärtuse. Mitmeseks testimiseks rakendati meetodit FDR (ingl k *false discovery rate*) (Benjamini ja Hochberg, 1995). FDR arvutamiseks kasutati R põhipaketi funktsiooni „*p.adjust*“, mille *method* parameetriks määrati väärtus „*fdr*“.

Korrelatsiooni arvutamisele eelnevalt jälgiti, et uuritavad tunnused oleksid normaaljaotuvusega. Tunnustele, mis algselt ei olnud normaaljaotuvusega rakendati logaritmilist transformatsiooni, mille tulemusel saadi lognormaaljaotusega tunnused. Korrelatsiooniks bakteriandmetega rakendati kõikidele bakterisagedustele arkussiinus-ruutjuur transformatsiooni, mis arvutati programmiga *MaAsLin* (ingl k *Multivariate Association with Linear Models*) (Morgan *et al.*, 2012). Korrelatsiooni *heatmap* jooniste tegemisel kasutati R funktsiooni „*labeledHeatmap*“ paketist *WGCNA*.

Gruppide keskmiste võrdlemisel ja vastavate jooniste tegemisel kasutati statistikatarkvara R paketi *ggpubr* funktsioone „*ggboxplot*“ ja „*stat_compare_means*“. Paariviisilisel gruppide keskmiste võrdlemisel rakendati Wilcoxon testi. Wilcoxon test on mitteparameetiline test ega eelda andmete normaaljaotuvust.

Šansside suhte (ingl k *odds ratio*) leidmiseks arvutati eksponentfunktsioon logistilise regressioonanalüüsi kordajatele. Logistilise regressiooni arvutamiseks kasutati statistikatarkvara R põhipaketi funktsiooni „*glm*“ (parameeter *family* väärtusega „binomial“). Sõltumatute tunnuste mõju statistilise olulisuse hindamiseks regressioonmudelile kasutati hii-ruut testi (χ^2 test, ingl k *chi-square test*). Šansside suhete jooniste tegemisel kasutati funktsiooni „*plotCI*“ paketist *gplots*.

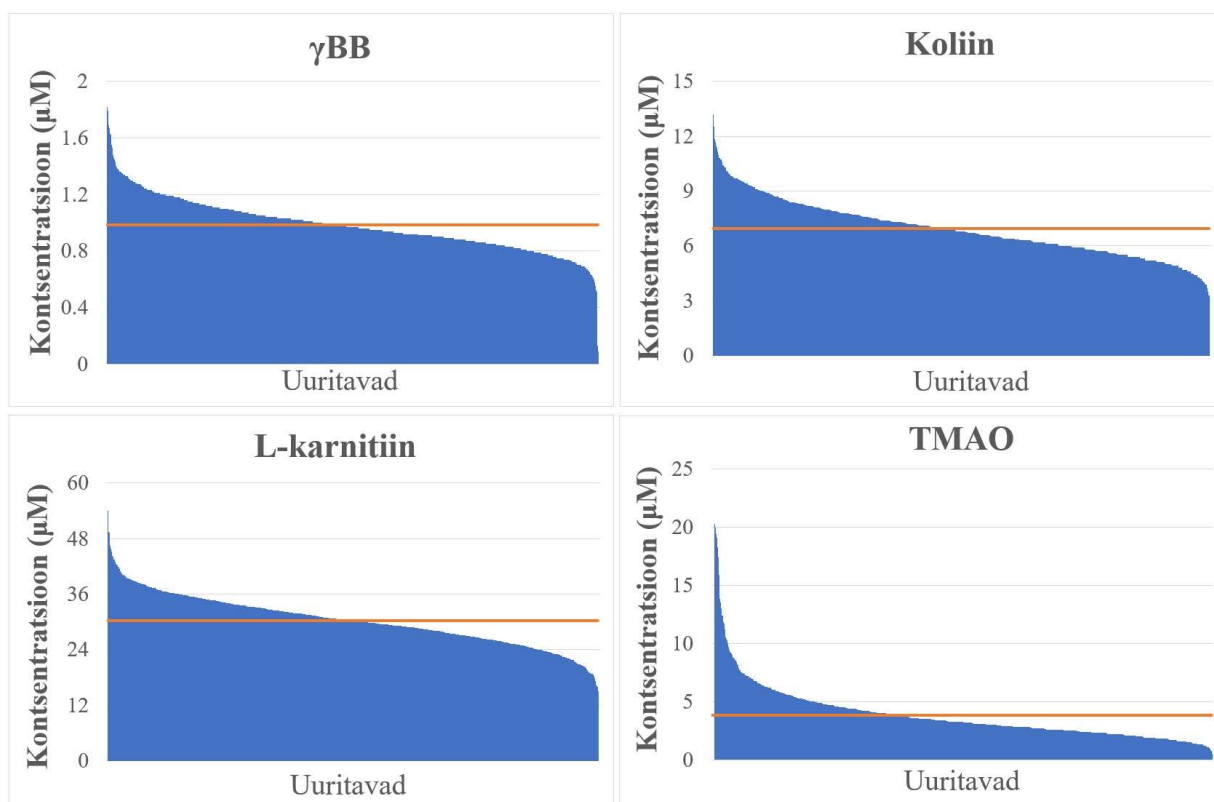
Lineaarse regressiooni arvutamiseks kasutati statistikatarkvara R põhipaketi funktsiooni „*lm*“ vaikeväärtustel ning jooniste tegemisel kasutati funktsiooni „*ggplot*“ paketist *ggplot2*.

Alfa- ja beetamitmekesisus arvutati kirjeldamaks mikrobioomi üldist varieeruvust valimis sõltuvalt uuritavate TMAO kontsentratsioonidest. Selleks jagati esmalt uuritavad TMAO kontsentratsioonide kvartiilide kaudu gruppidesse. Ühe grupi moodustasid individid, kelle TMAO kontsentratsioon kuulus esimesse kvartiili (25% kvartiil) ja teise grupi individid, kelle TMAO kontsentratsioon kuulus kolmandasse kvartiili (75% kvartiil). Alfa- ja beetamitmekesisuse arvutamiseks kasutati platvormi QIIME funktsiooni „*core_diversity_analysis*“, mille sisenditeks on eelnevalt kirjeldatud OTU tabel ja uuritavate gruppidesse jaotuvust kirjeldav tekstifail. Arvutusse kaasati iga indiviidi puhul 6300 juhuslikult valitud järjestust (parameeter -e 6300). Alfamitmekesisuse puhul võrreldi mõlema grupi keskmist operatiivsete taksonoomiaühikute (OTU) arvu ning beetamitmekesisuse puhul võrreldi gruppide sisest ja vaheliselt kaalutud *UniFrac*-i kaugust.

3. Tulemused

3.1. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO tasemete varieeruvus valimis

Käesolevas töös vaadati esmalt TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete (γ -butürobetaiin, koliin ja L-karnitiin) kontsentratsioone ja varieeruvust METSIM-i populatsioonis (N = 1438). L-karnitiini ja TMAO varieeruvus valimis on väga suur ning koliini ja γ -butürobetaiini varieeruvus on oluliselt väiksem (joonis 6 ja tabel 3). TMAO puhul on suuremal osal uuritavatest kontsentratsioon madalam kui keskvärtus (N = 909), kuid vaid mõnel inimesel on TMAO kontsentratsioon väga suur, üle 10 μ M on TMAO kontsentratsioon vaid 39 indiviidil 1438-st (joonis 6).



Joonis 6. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kontsentratsioonide varieeruvus valimis (N = 1438). Oranž horisontaalne joon tähistab kontsentratsioonide keskvärtust.

Tabel 3. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kontsentratsiooni varieeruvust valimis kirjeldavad karakteristikud (N = 1438)

Tunnus	Keskmine	SD	Min	Max	Varieeruvus
γ BB (γ -butürobetaiin) (μ M)	0,98	0,19	0,09	1,82	1,73
Koliin (μ M)	6,93	1,53	3,30	13,19	9,89
L-karnitiin (μ M)	30,32	5,42	13,70	53,90	40,20
TMAO (μ M)	3,83	2,42	0,50	20,29	19,79

3.2. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO seosed biomarkeritega

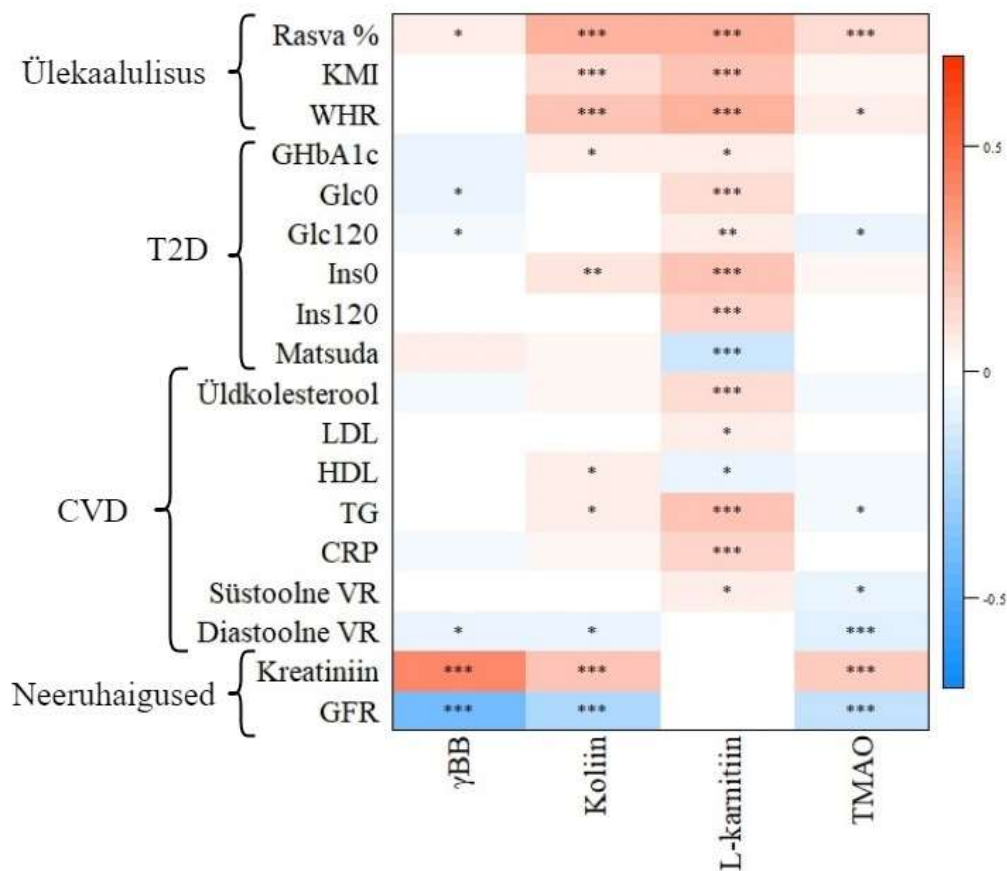
Uurimaks, millised tunnused on seotud TMAO sünteesirajaga, tehti korrelatsioonanalüüs TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete γ -butürobetaiini, koliini ja L-karnitiini ning selliste biomarkerite vahel, mis iseloomustavad varasemalt TMAO-ga seostatud haigusfenotüüpe (joonis 7, lisa 2). Südame-veresoonkonna haigusi esindavateks biomarkeriteks valiti kolesterooli taseme mõõdud (üldkolesterooli tase, LDL ja HDL kolesterool), triglütseriidide (TG) ja kõrge tundlikkusega C-reaktiivse valgu (ingl k *high-sensitive C-reactive protein*, hS-CRP) tase ning vererõhu (VR) mõõdud (süstoolne ja diastoolne). Neeruhaigustega seotud näitajateks valiti kreatiniini tase ning glomerulaarfiltratsiooni kiirus (ingl k *glomerular filtration rate*, GFR). II tüüpi diabeeti iseloomustavatest biomarkeritest valiti paastuglükoosi (Glc0) ja -insuliini tase (Ins0), suukaudse glükoositaluvuse testi tulemusel saadud glükoosi ja insuliini tase kaks tundi peale suhkru manustamist (Glc120, Ins120), glükohemoglobiini osakaal (GHbA1c) ning matsuda indeks. Lisaks valiti ülekaalule viitavad näitajaid nagu rasvaprotsent, kehamassiindeks (KMI), vöö ja puusa übermõõtude suhe (WHR). Statistiliselt oluliseks arvestati seosed, mille FDR < 0,1.

γ -butürobetaiinil on statistiliselt oluline seos neeruhaigustele viitavate biomarkeritega. Seos on positiivne kreatiniini kontsentratsiooniga ja negatiivne glomerulaarfiltratsiooni tasemega (P < 0,0001; FDR < 0,001), mis võib viidata positiivsele seosele γ -butürobetaiini ja neeruhaiguste vahel. Lisaks on γ -butürobetaiin piiripealse statistilise olulisusega seotud positiivselt rasvaprotsendiga ning negatiivselt glükoosi tasemetega (paastu ja 2h) ja diastoolse vererõhuga (P < 0,05; FDR < 0,1).

Koliin on statistiliselt oluliselt seotud kõikide vaadeldud ülekaalulisusele viitavate biomarkeritega ($P < 0,0001$; $FDR < 0,001$) ning sarnaselt γ -butürobetaiinile seotud positiivselt kreatiniini ja negatiivselt glomerulaarfiltratsiooni tasemega ($P < 0,0001$; $FDR < 0,001$). Lisaks on koliin seotud II tüüpi diabeedile viitavatest biomarkeritest glükohemoglobiini ja insuliini tasemega ning südame-veresoonkonna haigustele viitavatest biomarkeritest HDL kolesterooliga, triglütseriididega ning diastoolse vererõhuga ($P < 0,05$; $FDR < 0,1$).

L-karnitiin on statistiliselt oluliselt seotud ülekaalulisusele ($P < 0,0001$; $FDR < 0,001$), II tüüpi diabeedile ($P < 0,05$; $FDR < 0,1$) ning südame-veresoonkonna haigustele viitavate biomarkeritega ($P < 0,05$; $FDR < 0,1$), kuid erinevalt γ -butürobetaiinist, koliinist ja TMAO-st ei ole L-karnitiin seotud kummagi vaadeldud neeruhaigustele viitava biomarkeriga.

TMAO on statistiliselt oluliselt seotud rasvaprotsendiga, diastoolse vererõhuga ning neeruhaigustele viitavate biomarkeritega ($P < 0,0001$; $FDR < 0,001$). Piiripealse statistilise olulisusega korreleerus TMAO ka vöö- ja puusaümbermõõtude suhtega, glükoositasemega, mis oli mõõdetud kaks tundi peale suhkru manustamist ning triglütseriidide tasemega ja süstoolse vererõhu mõõduga ($P < 0,05$; $FDR < 0,1$).



Joonis 7. TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete (γ -butürobotaiin, koliin ja L-karnitiin) ning ülekaalulisusele ja rasvumisele, II tüüpi diabeedile, südame-veresoonkonna haigustele ja neeruhaigustele viitavate biomarkerite vaheline korrelatsioonanalüüs (N = 1438). Korrelatsioonanalüüsi arvulised väärtused on esitatud lisas 2. Lahtrite värvus ja värvi tugevus viitab korrelatsiooni koefitsendi väärtusele vastavalt parempoolsel vertikaalsel ribal kirjeldavale. * FDR < 0,1; ** FDR < 0,01; *** FDR < 0,001

3.3. γ -butürobotaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO seos prediabeediga

TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete ning biomarkerite vahelises korrelatsioonanalüüsis leiti, et ülekaalulisust ja rasvumist, II tüüpi diabeeti, südame-veresoonkonna haigusi ning neeru probleeme iseloomustavad biomarkerid on TMAO sünteesiraja komponentidega seotud. Saadud tulemused ei võimalda, aga otseselt järeltada TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete seost nimetatud haigusfenotüüpidega.

METSIM-i valimis on kõigile uuritavatele tehtud suukaudse glükoositaluvuse test, mille tulemusel on võimalik määrata lisaks diabeedile ka prediabeedi seisund. II tüüpi diabeedile eelnev prediabeedi seisund võib kesta aastaid, mistõttu on oluline tuvastada uusi biomarkereid, mis aitaksid hinnata haiguse kulgu. Seetõttu tekkis huvi, kuidas on uuritavad TMAO sünteesiraja metaboliidid seotud prediabeedi esinemisega. Käesolevas töös kasutatud prediabeedi mõiste on defineeritud peatükis „Materjal ja meetodika“.

Esmalt kirjeldati eelnevalt vaadeldud biomarkerite keskväärtuste erinevust tervetel inimestel ja prediabeetikutel (tabel 4). Oodatavalt leiti, et prediabeetikutel on tervetest inimestest keskmiselt kõrgemad ülekaalulisusele ja II tüüpi diabeedile viitavad näitajad (rasvaprotsent, kehamassiindeks ning vöö- ja puusaümberrõõtude suhe, glükoosi ja insuliini kontsentratsioonid, glükohemoglobiin ning matsuda indeks) ($P < 0,0001$). Lisaks on prediabeetikutel võrreldes tervete inimestega kõrgemad vererõhu näitajad ning triglütseriidide ja kõrge tundlikkusega C-reaktiivse valgu tasemed ($P < 0,01$). Vanuse erinevust tervete ja prediabeetikute vahel ei täheldatud, aga ilmselt on see tingitud METSIM-i valimisse kaasatud meeste väikesest vanusevahast.

Tabel 4. Tervete ja prediabeetikute gruppide biomarkerite keskmisi kirjeldav statistika. P-väärtused on arvatud Wilcoxon'i testiga.

Fenotüüp	Terved (N = 473)		PreT2D (N = 911)		P-väärtus
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	
Vanus	56,42	6,40	56,73	6,54	0,4302
γ -butürobetaiin	1,00	0,18	0,98	0,19	0,0344
Koliin	6,99	1,53	6,91	1,51	0,4386
L-karnitiin	29,61	5,73	30,69	5,22	0,0009
TMAO	4,02	2,77	3,77	2,23	0,1086
Rasvaprotsent	20,94	5,61	22,89	6,15	< 0,0001
KMI	25,87	3,16	27,35	3,59	< 0,0001
WHR	0,96	0,06	0,97	0,06	< 0,0001
GHbA1c	5,54	0,29	5,63	0,31	< 0,0001
Glc0	5,26	0,22	5,96	0,34	< 0,0001
Glc120	5,12	1,15	6,14	1,70	< 0,0001
Ins0	6,12	3,67	9,03	5,64	< 0,0001

Tabel 4 jätk. Tervete ja prediabeetikute gruppide biomarkerite keskmisi kirjeldav statistika.

Fenotüüp	Terved (N = 473)		PreT2D (N = 911)		P-väärtus
	Keskmine	SD	Keskmine	SD	
Ins120	31,79	27,60	50,97	50,70	< 0,0001
Matsuda	9,87	4,85	6,39	3,41	< 0,0001
Üldkolesterool	5,52	0,88	5,50	0,92	0,6098
LDL	3,54	0,79	3,49	0,80	0,3178
HDL	1,53	0,39	1,46	0,38	0,0036
TG	1,20	0,66	1,43	0,85	< 0,0001
hS-CRP	1,48	1,90	2,00	4,22	0,0056
Süstoolne VR	129,41	13,80	133,85	14,20	< 0,0001
Diastoolne VR	83,85	8,76	86,45	8,70	< 0,0001
Kreatiniin	83,54	10,40	81,35	9,40	0,0014
GFR	0,090	0,014	0,093	0,013	0,0018

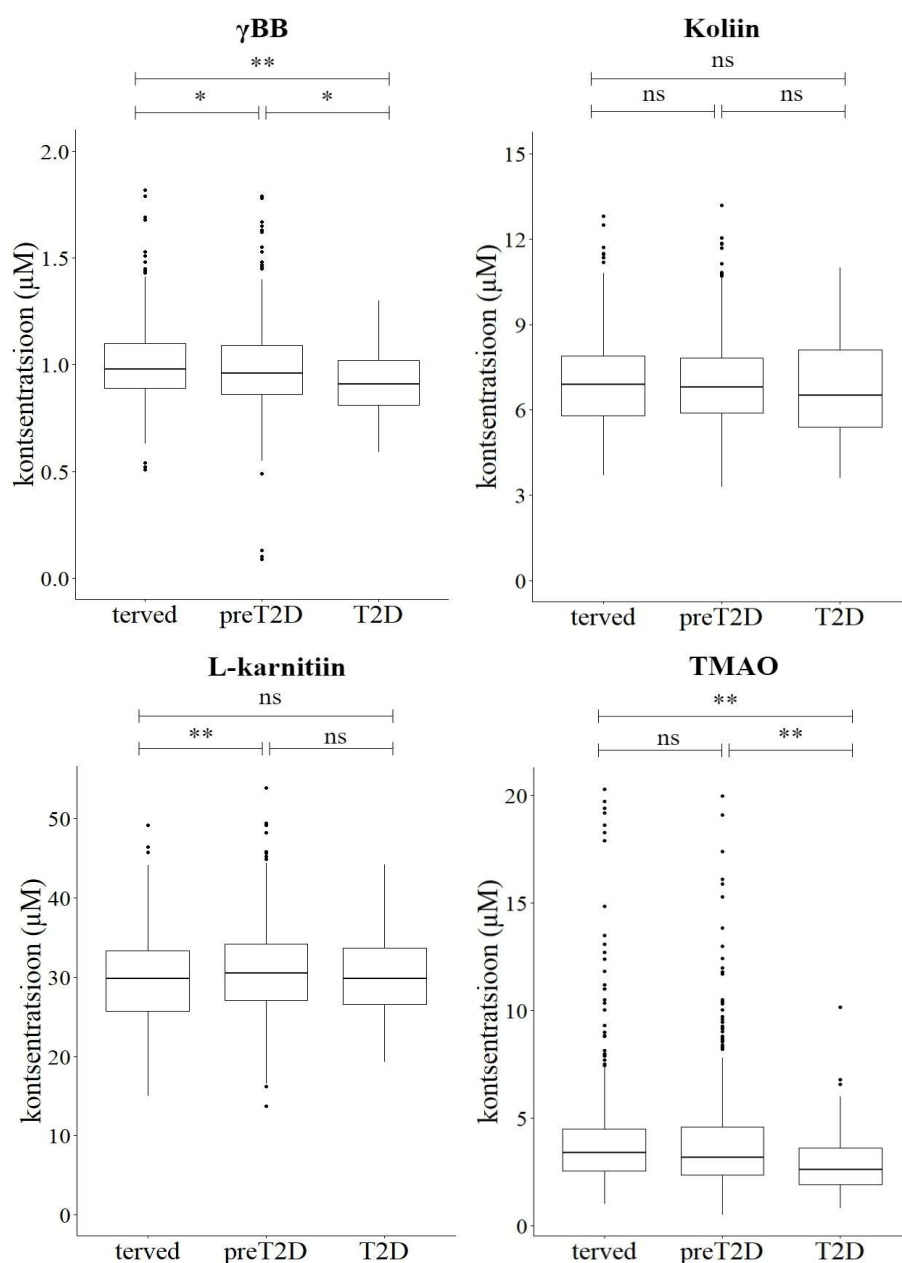
Järgmiseks vaadeldi, kas tervetel (N = 473), prediabeetikutel (N = 911) ja diabeetikutel (N = 53) erineb γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kontsentratsioon (joonis 8) ning, kas kõrge TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete kontsentratsiooni puhul on suurem või väiksem šans prediabeedi esinemiseks (joonis 9, lisa 3). Šansside suhte leidmiseks jagati individid sõltuvalt vastava metaboliidi kontsentratsioonist nelja kvartiili (esimeses kvartiilis 25% kõige madalama kontsentratsiooniga indiviidi ja neljandas 25% kõige kõrgema kontsentratsiooniga indiviidi). Seejärel arvutati kehamassiindeksile kohandatud logistilise regressioonanalüüsiga šansside suhe (ingl k *odds ratio*, OR) esimesse kvartiili kuuluvate individide ja teistesse kvartiilidesse kuuluvate individide prediabeedi šansside vahel (joonis 9).

γ -butürobetaiini kontsentratsioon on prediabeetikutel ($P < 0,05$) ja diabeetikutel ($P < 0,01$) madalam kui tervetel individidel ning diabeetikutel madalam kui prediabeetikutel ($P < 0,05$) (joonis 8). Samuti on madala γ -butürobetaiini kontsentratsiooni puhul suurem šans prediabeedile kui kõrge kontsentratsiooni juures, sest kolmanda ja neljanda kvartiili šansside suhete 95% usaldusintervallid on väiksemad kui üks ($P < 0,05$) (joonis 9, lisa 3). Antud tulemused viitavad sellele, et γ -butürobetaiin on negatiivselt T2D-ga seotud ning, mida tõsisem on diabeedi diagnoos, seda madalam on γ -butürobetaiini kontsentratsioon.

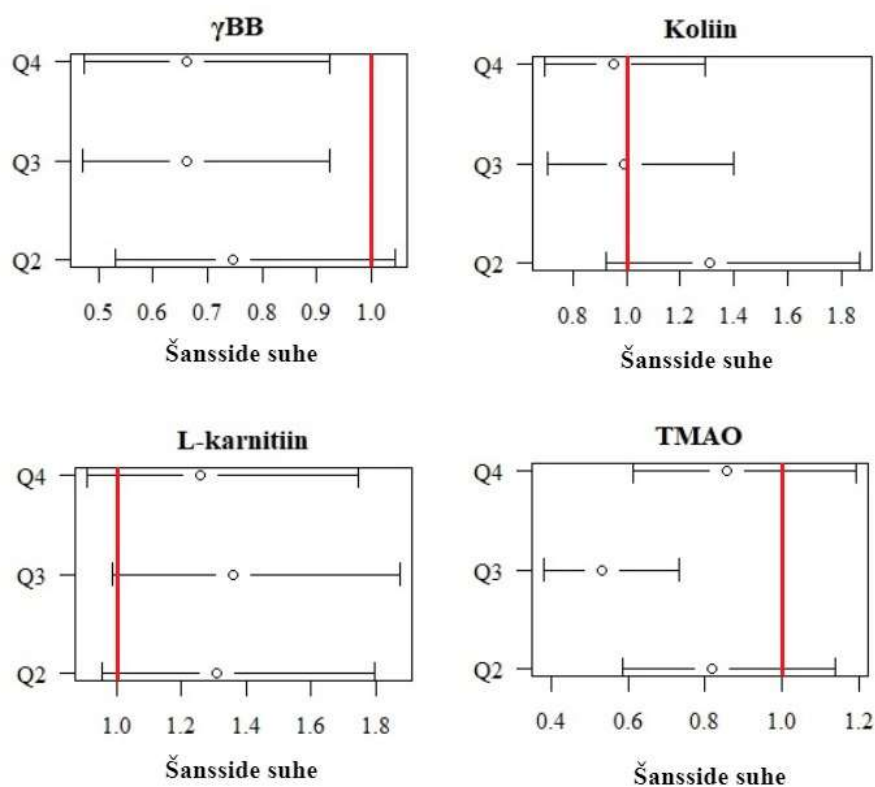
Koliini kontsentratsioon vaadeldud gruppide vahel ei erine ($P > 0,05$) (joonis 8). Samuti ei erine teise, kolmanda ega neljanda kvartiili prediabeedi šanss esimesest (joonis 9, lisa 3). Antud tulemused viitavad sellele, et II tüüpi diabeet ei ole koliini kontsentratsiooniga seotud.

L-karnitiini kontsentratsioon on prediabeetikutel kõrgem kui tervetel ($P < 0,001$), kuid diabeetikute L-karnitiini kontsentratsiooni erinevus tervetest ei ole statistiliselt oluline (joonis 8). Samuti ei erine teise, kolmanda ega neljanda kvartiili prediabeedi šanss esimesest (joonis 9, lisa 3). Prediabeetikute kõrgem L-karnitiini kontsentratsioon võib viidata L-karnitiini positiivsele seosele T2D-ga, kuid šansisuhete analüüs antud tulemust ei toeta.

TMAO kontsentratsioon on diabeetikutel madalam kui tervetel indiviididel ($P < 0,01$) ning prediabeetikutel ($P < 0,01$), kuid prediabeetikute TMAO kontsentratsioon on samal tasemel tervetega (joonis 8). Kolmandasse kvartiili kuuluvatel ja kõrgema TMAO kontsentratsiooniga indiviididel on väiksem prediabeedi šanss kui esimesse kvartilli kuuluvatel ja väiksema TMAO kontsentratsiooniga indiviididel ($P < 0,0001$) (joonis 9, lisa 3). Samas ei erine aga neljanda kvartiili TMAO kontsentratsiooni prediabeedi šanss esimesest kvartiilist. Nii diabeetikute madalam TMAO kontsentratsioon kui kolmanda kvartiili väiksem šanss võivad viidata negatiivsele seosele T2D-ga, kuid šansisuhe kõige kõrgemat TMAO taset koondava neljanda kvartiili ja kõige madalamat TMAO taset koondava esimese kvartiili vahel antud tulemust ei toeta.



Joonis 8. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kontsentratsioonide erinevus tervetel, prediabeetikutel ja diabeetikutel. Valimi suurus on 1438 indiviidi, kellest terveid on 473, prediabeetikuid 911 ja T2D diagnoosiga indiviide 53. Statistiline olulisus on arvutatud Wilcoxon'i testiga. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ns – seos ei ole statistiliselt oluline ($P > 0,05$)

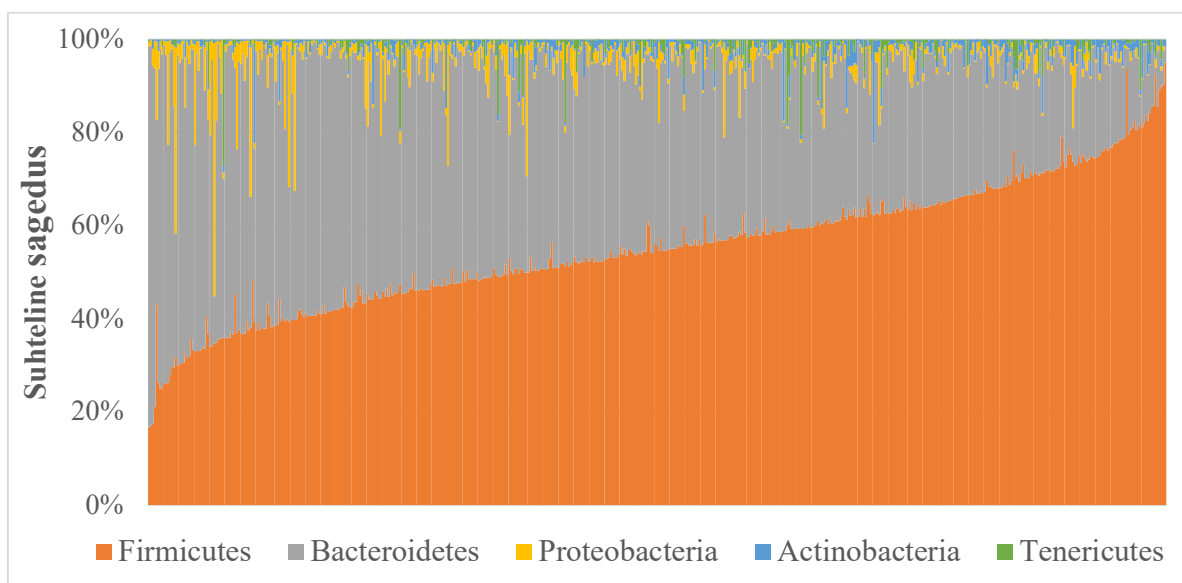


Joonis 9. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kvartiilide šansside suhe esimese kvartiili vastu koos 95% usaldusintervallidega. Punane vertikaalne joon tähistab šansisuhet 1, mis näitab, et kvartiilide šansid ei ole erinevad. Q2 – 2. kvartiil (kuni mediaan), Q3 – 3. kvartiil (75% kvartiil), Q4 – 4. kvartiil (kuni maksimumväärtus)

3.4. Soolestiku mikrobioomi kirjeldav analüüs

Käesolevas töös uuritav metaboliit TMAO moodustub bakterite vahendatud metabolismi käigus, mistõttu sooviti leida, millised antud populatsioonis esinevad soolestiku mikroobid võivad olla olulised TMAO sünteesirajas. Selleks viidi esmalt läbi uuritava valimi soolestiku mikrobioomi kirjeldav analüüs.

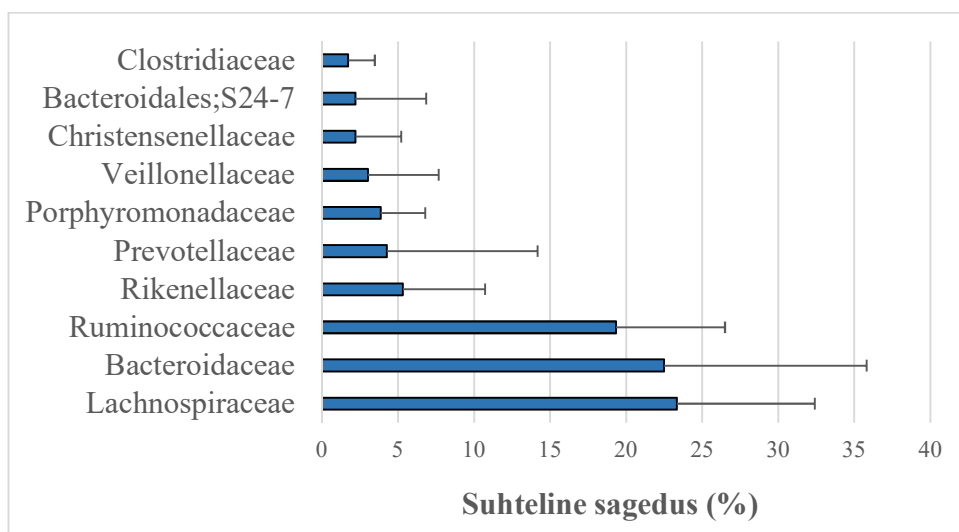
Oodatavalt esines METSIM-i valimi soolestiku mikrobioomi koosluses suur mitmekesisus. Kooskõlas varasemate töödega on antud valimi soolestikus sagedasemateks hõimkondadeks *Firmicutes* (keskmise 54,50%, vahemik 16,47 – 94,96%) ja *Bacteroidetes* (keskmise 38,43%, vahemik 1,39 – 81,87%). Kokku klasterdati OTU-d 17 hõimkonda, 31 klassi, 71 seltsi, 144 sugukonda ja 384 perekonda. Mikrobioomi varieeruvus hõimkondade tasandil on kujutatud joonisel 10.



Joonis 10. Soolestiku mikrobioomi varieeruvus METSIM andmestikus (N=531). Tulbad väljendavad hõimkondade osakaalu ühe inimese mikrobioomis.

Kümnesse kõige sagedamasse sugukonda klasterdusid 87,78% järjestustest ning nendeks sugukondadeks olid *Lachnospiraceae* (23,33% järjestusest, SD = 9,07), *Bacteroidaceae* (22,50% järjestustest, SD = 13,32), *Ruminococcaceae* (19,34% järjestustest, SD = 7,16), *Rikenellaceae* (5,32% järjestustest, SD = 5,41), *Prevotellaceae* (4,27% järjestustest, SD = 9,91), *Porphyromonadaceae* (3,85% järjestustest, SD = 2,94), *Veillonellaceae* (3,02% järjestustest, SD = 4,67), *Christensenellaceae* (2,21% järjestustest, SD = 3,00), seltsi Bacteroidales sugukond S24-7 (2,20% järjestustest, SD = 4,67), *Clostridiaceae* (1,74% järjestustest, SD = 1,74) (joonis 11).

Järgnevatiks mikrobioomi analüüsideks filtreeriti OTU tabelist välja harva esinevad OTU-d, mis esinesid vähem kui 50% uuritavatest, et vähendada valepositiivseid tulemusi. Filtreerimise tulemusel jäi alles 412 OTU-d, mis kuulusid 5 hõimkonda, 12 klassi, 13 seltsi, 23 sugukonda ja 52 perekonda (lisa 4).

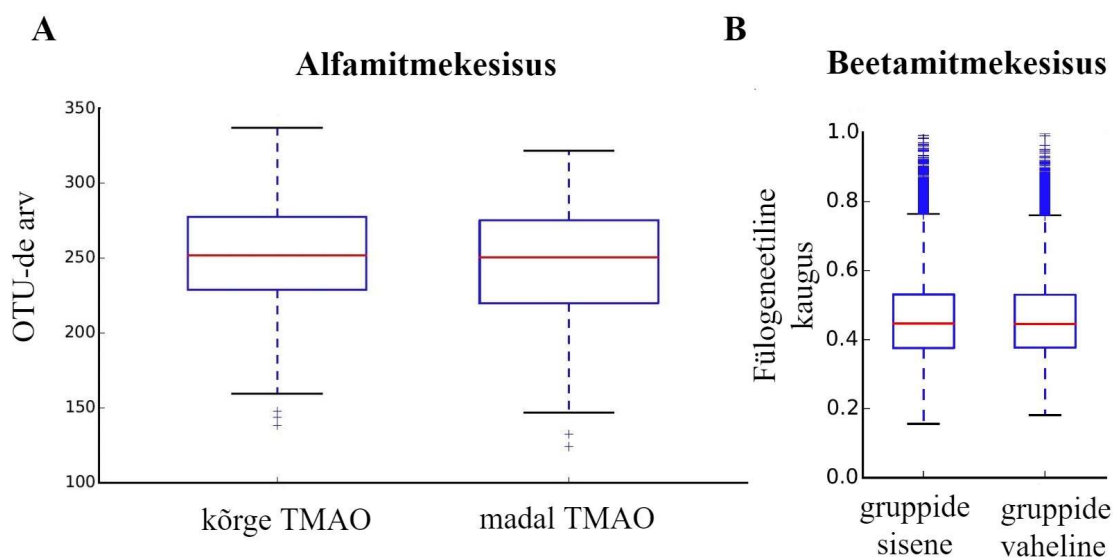


Joonis 11. Valimi soolestiku mikrobioomi kümne kõige sagedama sugukonna osakaal. Joonisel on näidatud keskmine osakaal standardhälbega (N = 531).

3.5. Alfa- ja beetamitmekesisuse erinevused kõrge ja madala TMAO puhul

TMAO mõju kirjeldamiseks soolestiku mikrobioomile võrreldi esmalt alfa- ja beetamitmekesisust TMAO kontsentratsiooni järgi jaotatud gruppides vastavalt peatükis „Materjal ja meetodika“ kirjeldatule (joonis 12). Alfamitmekesisus kirjeldab, kui palju varieerub mikrobioom ühe grupi siseselt. Beetamitmekesisus kirjeldab aga, gruppidevahelist liigilise koosseisu erinevust.

Tulemustest selgus, et kõrge ja madala TMAO kontsentratsiooni järgi jaotatud gruppide alfamitmekesisus on sarnane ($P < 0,05$) (joonis 12A). Samuti ei erine kahe grupi vaheline ja gruppidesisene beetamitmekesisus ($P < 0,05$) (joonis 12B), mis tähendab, et mikrobioomi erinevus gruppide vahel ei ole suurem kui grupi siseselt. Antud tulemused viitavad sellele, et antud valimis ei mõjuta TMAO soolestiku mikrobioomi üldist varieeruvust.

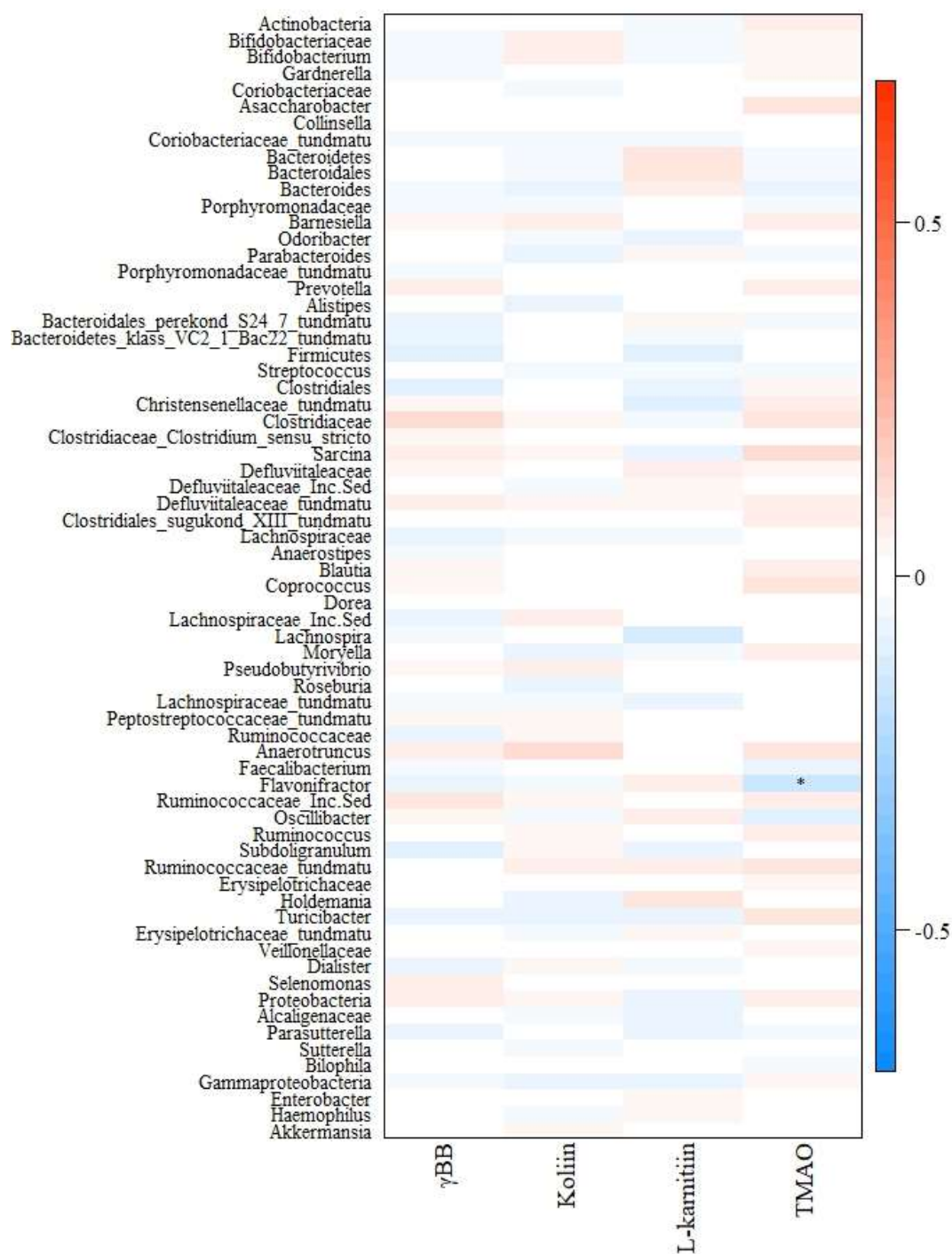


Joonis 12. Alfa- ja beetamitmekesisus kõrge ja madala TMAO puhul (N = 531). **A** Keskmine OTU-de arv kõrge ja madala TMAO kontsentratsiooni puhul. **B** Mikrobioomi fülogeneetiline kaugus (kaalutud *UniFrac*) kõrge ja madala TMAO kontsentratsiooni gruppide siseselt ja vaheliselt. ns – seos ei ole statistiliselt oluline ($P > 0,05$)

3.6. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO seosed soolestiku mikroobidega

Uurimaks, millised soolestiku mikroobid võivad olla TMAO sünteesirajas olulised, tehti korrelatsioonanalüüs valimis esindatud soolestiku mikroobide taksonite ning γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO vahel (joonis 13, lisa 5). Statistiliselt oluliseks arvestati suure arvu statistiliste testide tõttu seosed, mille $FDR < 0,2$.

Antud korrelatsioonanalüüsis leiti vaid üks statistiliselt oluline seos, milleks oli negatiivne korrelatsioon TMAO ja bakteriperekonna *Flavonifractor* vahel ($P < 0,001$; $FDR < 0,2$; $bicor = -0,152$; *Flavonifractor*-i osakaal 0,09% (lisa 4)). *Flavonifractor* kuulub sugukonda Ruminococcaceae, mille tundmatul perekonnal on varasemalt kirjanduses näidatud positiivne seos TMAO kontsentratsiooniga.



Joonis 13. Korrelatsioon andmestikus leiduvate bakteritaksonite ning γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO vahel (N = 531). Korrelatsioonanalüüsi arvulised väärtused on esitatud lisas 2. Lahtrite värvus ja värvi tugevus viitab korrelatsiooni koefitsendi väärtusele vastavalt parempoolsel vertikaalsel ribal kirjeldavale. * FDR < 0,2

Lisaks antud seosele leiti 19 seost, mille p-väärtus oli alla 0,05, kuid mis ei osutunud statistiliseks oluliseks pärast mitmetest testimist. Neid seoseid võrreldi eelnevalt kirjanduses leitud seostega (tabel 5 ja lisa 1). Varasemalt kirjanduses TMAO ja selle sünteesiraja lähteainetega seostatud bakterisugukondadest leiti käesolevas töös seos sugukonda *Lachnospiraceae* kuuluvatel perekondadel *Coprococcus* ja *Lachnospira*, sugukonnast *Erysipelotrichaceae* perekondadel *Holdemania* ja *Turcibacter*, sugukonnast *Ruminococcaceae* lisaks *Flavonifractor* perekondadel *Anaerotruncus*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* ja kahel tundmatul perekonnal ning sugukonnast *Clostridiaceae* perekonnal *Sarcina*.

Tabel 5. Käesolevas töös leitud TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete seosed bakterisugukondadega, mida on varasemalt kirjanduses TMAO ja selle sünteesiraja lähteainetega seostatud, ja vastavatesse sugukondadesse kuuluvate perekondadega. Esitatud on seosed, mille p-väärtus on käesoleva töö korrelatsioonianalüüsis alla 0,05 (lisa 5).

Sugukond	Perekond	Metaboliit (käesolev töö)	Metaboliit (varasemad tööd)*
<i>Lachnospiraceae</i>			γ BB, TMAO (-)**
	<i>Coprococcus</i>	TMAO (+)	
	<i>Lachnospira</i>	L-karnitiin (-)	TMAO (-)
<i>Erysipelotrichaceae</i>			TMAO (+)**
	<i>Holdemania</i>	L-karnitiin (+)	
	<i>Turcibacter</i>	TMAO (+)	
<i>Ruminococcaceae</i>	Tundmatu	TMAO (+)	TMAO (+)**
	<i>Anaerotruncus</i>	TMAO, koliin (+)	
	<i>Flavonifractor</i>	TMAO (-)	TMAO (+)
	<i>Inc. sed</i>	γ BB (+), TMAO (-)	
	<i>Oscillibacter</i>	TMAO (-)	TMAO (+)
	<i>Subdoligranulum</i>	γ BB (-)	TMAO (+)
<i>Clostridiaceae</i>		γ BB, TMAO (+)	TMAO (-)
	<i>Sarcina</i>	TMAO (+)	

„+“ positiivne ja „-“ negatiivne seos taksoni ja metaboliidi vahel; Rasvases kirjas on märgitud seosed, mis ühtivad kirjanduses ja käesolevas töös.

* kasutatud allikad: Koeth *et al.*, 2013, 2014; Schmedes *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2011

** Bakteri ja metaboliidi vaheline seos on leitud hiire mudelis.

3.7. *cutC/D*, *cntA/B* ja *yeaW/X* geeniklastriid METSIM-i valimi mikrobioomis

Varasemalt on kirjanduses leitud, et bakterid kasutavad γ -butürobetaiini, koliini ja L-karnitiini lagundamiseks ja TMA tootmiseks *cutC/D*, *cntA/B* ja *yeaW/X* geeniklastreid. Järgnevalt sooviti vaadata, kas METSIM andmestiku mikrobioomis leidub nimetatud geeniklastreid. Selleks kasutati programmi PICRUSt (Langille *et al.*, 2013), mis ennustab 16S rRNA andmete põhjal, millised geenid on mikrobioomis esindatud. PICRUSt programm on ühendatud KEGG Orthology andmebaasiga (Kanehisa ja Goto, 2000; Kanehisa *et al.*, 2016, 2017) ning ennustatud mikrobioomis esindatud geenid esitatakse KO koodidena. Vaadeldavate geeniklastrite KO koodid on esitatud tabelis 6.

Geeniklastreid *cutC/D* ja *cntA/B* antud valimi mikrobioomist ei leitud. *YeaW* geeni leiti perekondadest *Sphingobium* ja *Acinetobacter* ning sugukonnast *Enterobacteriaceae*. *YeaX* geen leiti kõikidest valimis esindatud hõimkondadest. *YeaW/X* geeniklastri on laiema funktsionaalsusega kui *cutC/D* ja *cntA/B* geeniklastriid ning on ilmselt vajalik ka muudes protsessides kui TMAO sünteesirada.

Tabel 6. *CutC/D*, *cntA/B* ja *yeaW/X* geeniklastrite KEGG Orthology andmebaasi koodid

Geeni nimi	KO kood
<i>cutC</i>	K20038
<i>cutD</i>	K20037
<i>cntA</i>	K22443
<i>cntB</i>	K22444
<i>yeaW</i>	K00470
<i>yeaX</i>	K00540

KO kood – KEGG Orthology andmebaasi kood

3.8. Soolestiku mikroobide ja preT2D koosmõju TMAO kontsentratsioonile

Eelnevalt vaadeldi, millised bakterid antud valimis võivad otseselt TMAO tasemega seotud olla, kuid bioloogilised seosed ei ole alati vaid kahe osapoole vahel. Tihti mängivad kahe tunnuse omavahelises seoses olulist rolli ka mingi kolmas või neljas tunnus. Seepärast sooviti järgmiseks leida, kas TMAO kontsentratsiooni võib mõjutada mingi bakteri ja haigusfenotüübi koosmõju. Eelnevalt selgus, et II tüüpi diabeet ja TMAO tase veres võivad olla seotud, sest diabeetikute

TMAO kontsentratsioon oli madalam kui tervetel indiviididel. Sellest tulenevalt tekkis küsimus, kas diabeedi ja mõne soolestikus leiduva bakteri koosmõju võib mõjutada TMAO kontsentratsiooni. Antud valimis oli T2D diagnoosiga indiviide vähe ning seetõttu võrreldi seoseid tervetel ja prediabeetikutel. Selleks viidi läbi lineaarne regressioonianalüüs kahes etapis.

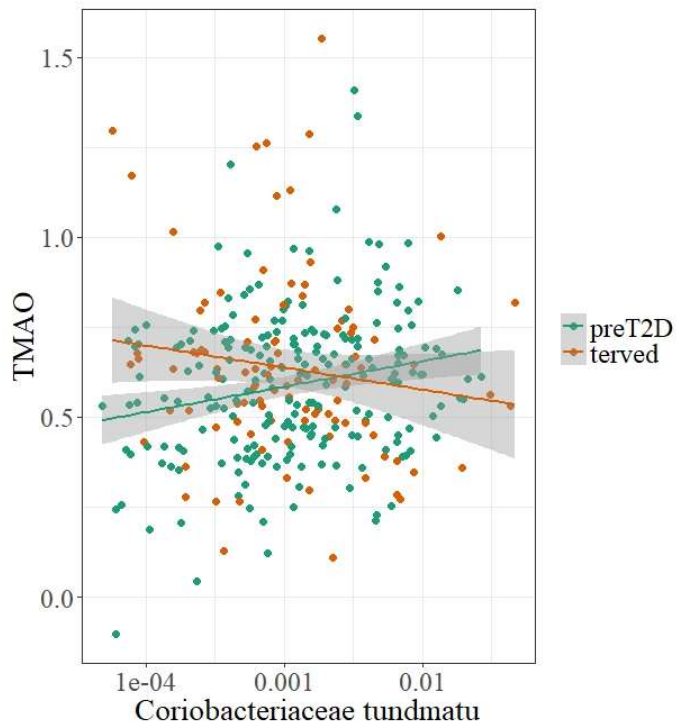
Regressioonanalüüsi ühel juhul vaadeldi bakterit kui binaarset tunnust ehk, kas bakterit esineb uuritava mikrobioomis või mitte. Teisel juhul vaadeldi bakterit kui kvantitatiivset tunnust, mis sisaldas bakteri suhtelisi sagedusi, kuid analüüsi kaasati vaid sellised uuritavaid, kelle mikrobioomis antud bakterit esines. Lineaarne regressioon arvutati statistikatarkvara R abil järgmise valemiga:

```
lm(TMAO ~ bakter + preT2D + preT2D*bakter)
```

Lm tähistab lineaarse regressiooni funktsiooni, TMAO kontsentratsiooni vereplasmas (μM), bakter konkreetse bakteri suhtelisi sagedusi uuritavate mikrobioomis kvantitatiivse analüüsi puhul ja binaarse analüüsi puhul väärtusi 1 või 0 vastavalt, kas bakterit indiviidi mikrobioomis esines või mitte ning preT2D tähistab prediabeedi seisundit binaarse tunnusena.

Binaarsel analüüsil ei leitud ühtegi bakteritaksonoomiat, mille koosmõju prediabeedi seisundiga oleks mõjutanud TMAO kontsentratsiooni statistiliselt oluliselt.

Kvantitatiivselt analüüsil leiti statistiliselt oluline koosmõju *Coriobacteraceae* sugukonna kultiveerimata perekonna puhul ($P < 0,01$) (joonis 14). Leiti, et ühe bakteri ühiku suurenemisel tervetel indiviididel väheneb TMAO kontsentratsioon $0,06 \mu\text{M}$ (95% usalduspiir $-0,14 - 0,01$) ja prediabeetikutel suureneb $0,13 \mu\text{M}$ (95% usalduspiir $0,04 - 0,22$).



Joonis 14. *Coriobacteraceae* sugukonna kultiveerimata perekonna mõju TMAO kontsentratsioonile tervetel indiviididel ja prediabeetikutel. Tervetel indiviididel põhjustab antud bakteri sagedus TMAO taseme langust, kuid prediabeedi puhul tõusu. Kasutatud on indiviidide andmeid, kellel antud bakterit esines (N = 317).

4. Arutelu

Viimastel aastatel on leitud üha rohkem tõendeid, et soolestiku mikroobid on seotud mitme tänapäeva ühiskonnas laialt levinud haigusega nagu südame-veresoonkonna haigused ja ainevahetuse häired (Qin *et al.*, 2012; Turnbaugh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Yamashiro *et al.*, 2017). Siiski ei ole nende seoste taga olevad mehhanismid veel täielikult teada. Üheks võimalikuks vahendajaks selles seoses on mikroobide vahendatud metabolismi käigus moodustuv metaboliit, TMAO. TMAO on pälvinud suurt tähelepanu alates 2011. aastast, kui leiti selle seos südame-veresoonkonna haigustega (Wang *et al.*, 2011). Seda on hiljem seostatud ka neeruhaigustega ja ainevahetushäiretega, nagu II tüüpi diabeet ja ülekaalulisus (Missailidis *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2015; Schugar *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2015). TMAO on laialdast huvi pakkunud, sest seda peetakse uueks võimalikuks biomarkeriks ning esimeseks potentsiaalseks soolestiku mikrobiomi sihtmärgiks nimetatud haiguste ennetamisel ning ravis. Kuigi TMAO on paljulubav uurimisobjekt ei ole päris kõik siiani teostatud populatsiooniuuringud suutnud eelnevalt nimetatud seoseid näha (Bidulescu *et al.*, 2007; Nagata *et al.*, 2015). Sellest tulenevalt oli käesoleva töö üheks eesmärgiks leida, milliste haigustunnustega on TMAO seotud Soomest pärit keskealiste meeste populatsioonis. Lisaks oli käesoleva töö teiseks eesmärgiks leida, millised antud populatsioonis esinevad soolestiku mikroobid võivad olla olulised TMAO sünteesirajas.

Käesolev töö tugines METSIM-i andmestikule, mis on Soomes Kuopio linnas ja selle ümbruses kogutud keskealiste meeste valim (Laakso *et al.*, 2017). METSIM-i valim sisaldab lisaks genoomi ja mikrobiomi andmetele põhjalikku informatsiooni erinevate tunnuste kohta. Kogu valim on üks suurimaid lokaalset populatsiooni kirjeldavatest andmestikest.

Esmalt vaadeldi käesolevas töös, kuidas TMAO ja selle sünteesiraja lähteained γ -butürobetaiin, koliin ja L-karnitiin on seotud erinevatele haigustele viitavate biomarkeritega, leidmaks, milliste haigustega TMAO ja selle sünteesiraja lähteained võivad olla seotud (joonis 7). Tänu suukaudse glükoositaluvuse testile võimaldas METSIM-i andmestik vaadelda ka TMAO sünteesiraja metaboliitide seoseid prediabeedi esinemisega (joonised 8 ja 9). Edasi uuriti käesolevas töös TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete seost soolestiku mikrobiomiga (joonised 12 ja 13) ning vaadeldi, milliseid teadaolevaid TMAO tootmises olulisi geeniklastreid (tabel 6) antud valimi mikrobiomis esineb. Lisaks uuriti, millistel mikroobidel on prediabeediga koosmõju TMAO-le (joonis 14).

Varasemalt on näidatud, et hiirtel põhjustas γ -butürobetaiini, koliini ja L-karnitiini rikka toidu tarbimine kõrge TMAO taset veres, mis soodustas südame-veresoonkonna haiguste teket (Koeth *et al.*, 2013, 2014; Wang *et al.*, 2011). Samuti on inimestel seostatud kõrge TMAO taset südame-veresoonkonna probleemide tekkimisega (Heianza *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2011). Sellest tulenevalt sooviti käesolevas töös leida, kas antud populatsioonis esineb seos TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete ning südame-veresoonkonna haigustele viitavate biomarkerite vahel. Selleks tehti korrelatsioonanalüüs, kus südame-veresoonkonna haigustele viitavatest biomarkeritest kaasati kolesterooli (üldkolesterool, LDL ja HDL), triglütseriidide ja kõrge tundlikkusega C-reaktiivse valgu tase ning vererõhu mõõdud (süstoolne ja diastoolne) (tabel 1, joonis 7, lisa 2). Korrelatsioonanalüüsil selgus, et L-karnitiin on negatiivselt seotud HDL kolesterooli tasemega ning positiivselt kõikide ülejäänud vaadeldud biomarkeritega, viidates L-karnitiini võimalikule positiivsele seosele südame-veresoonkonna haigustega (joonis 7, lisa 2). TMAO oli südame-veresoonkonna haigustele viitavatest biomarkeritest statistiliselt oluliselt seotud vaid triglütseriidide tasemega ja mõlema vererõhu näiduga ning kõik nimetatud seosed olid antud valimis negatiivsed. Antud tulemused võivad viidata, vastupidiselt siiani kirjanduses näidatule, TMAO negatiivsele seosele südame-veresoonkonna haigustega. Korrelatsioonanalüüs biomarkeritega ei võimalda küll näidata otsest seost haigusega, kuid antud tulemused viitavad sellele, et vähemalt L-karnitiinil ja TMAO-l võib olla antud valimis seos südame-veresoonkonna haigustega, mida tuleks aga edasi uurida otseselt diagnoositud haigetel ja tervetel.

Lisaks südame-veresoonkonna haigustele on leitud, et kõrge TMAO tase viitab ka neeruprobleemidele ja ainevahetushäiretele (Missailidis *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2015; Schugar *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2015), mistõttu kaasati eelnevalt mainitud korrelatsioonanalüüsi ka nimetatud haigustega seotud biomarkerid (tabel 1, joonis 7, lisa 2). Neerunäitajatest kaasati kreatiniini kontsentratsioon ja glomerulaarfiltratsiooni tase, millega korreleerus γ -butürobetaiini, koliini ja TMAO kontsentratsioon. Antud tulemused võivad viidata nimetatud metaboliitide positiivsele seosele neeruhaigustega, mis kattub ka kirjandusest leitud, kus TMAO-d peetakse neeruhaigustele paljulubavaks biomarkeriks (Missailidis *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2015).

Ainevahetushäiretest on TMAO-d seostatud II tüüpi diabeediga ja ülekaalulisusega. On näidatud, et II tüüpi diabeediga inimestel on oluliselt kõrgem TMAO kontsentratsioon kui tervetel indiviididel ning kõrge TMAO tasemega indiviididel on suurem šans haigestuda II tüüpi diabeeti. Lisaks on ülekaalulisust seostatud TMAO kontsentratsiooniga veres hiirekatsete põhjal

ning FMO3 ekspressiooni tasemega METSIM-i andmestikus. (Schugar *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2017) Ülekaalulisusele viitavatest biomarkeritest kaasati korrelatsioonanalüüsi kehamassiindeks, keha rasvaprotsent ning vöö- ja puusaümbermõõtude suhe (tabel 1, joonis 7, lisa 2). Antud korrelatsioonanalüüsist leiti, et TMAO kontsentratsioon oli statistiliselt oluliselt seotud kahega kolmest (rasvaprotsent ning vöö- ja puusaümbermõõtude suhe) vaadeldud ülekaalulisusega seotud biomarkerist, mis võib viidata, sarnaselt kirjanduses näidatule, et TMAO kontsentratsioon on ülekaalulisusega positiivselt seotud. Lisaks võivad korrelatsioonanalüüsi põhjal olla ülekaalulisusega positiivselt seotud ka koliin ja L-karnitiin, mis korreleerusid positiivselt kõikide vaadeldud ülekaalulisusele viitavate biomarkeritega.

II tüüpi diabeedile viitavatest biomarkeritest kaasati korrelatsioonanalüüsi glükoonitud hemoglobiini osakaal, glükoosi ja insuliini kontsentratsioonid (paastu ja 2h peale suhkru tarbimist) ning matsuda indeks (tabel 1, joonis 7, lisa 2). Lisaks korrelatsioonanalüüsile võrreldi II tüüpi diabeedi puhul suukaudse glükoositaluvuse testi tulemustest lähtuvalt haigete, tervete ning prediabeetikute γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kontsentratsiooni veres ning hinnati prediabeedi esinemise šanss lähtuvalt TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete kontsentratsioonist (joonised 8 ja 9, lisa 3). L-karnitiin korreleerus negatiivselt matsuda indeksiga ning positiivselt kõikide ülejäänud T2D-le viitavate biomarkeritega (joonis 7, lisa 2). Samuti leiti, et prediabeetikutel oli kõrgem L-karnitiini kontsentratsioon kui tervetel, kuid kõrgem L-karnitiini kontsentratsioon ei põhjutanud suuremat prediabeedi šanssi (joonised 8 ja 9, lisa 3). TMAO ja γ -butürobetaiini kontsentratsioon olid negatiivselt seotud glükoosi tasemetega ning leiti, et diabeetikutel on madalam TMAO ja γ -butürobetaiini ning prediabeetikutel madalam γ -butürobetaiini tase kui tervetel (joonis 7 ja 8, lisa 2). Lisaks leiti, et kõrge γ -butürobetaiini kontsentratsiooniga indiviididel on suurem šanss prediabeedi esinemisele (joonis 9 ja lisa 3). Kuigi suurem šanss prediabeedi esinemisele oli ka TMAO kontsentratsiooni kolmanda kvartiili puhul, siis neljanda kvartiili puhul kõrgemat šanssi ei esinenud. Antud tulemused võivad viidata L-karnitiini positiivsele ning TMAO ja γ -butürobetaiini negatiivsele seosele II tüüpi diabeediga, kuid selgete seoste leidmiseks on vajalik suurem T2D diagnoosiga haigete osakaal.

Varasemalt kirjanduses teadaolevaga ühtis käesolevas töös TMAO, L-karnitiini ja koliini võimalik positiivne seos ülekaalulisusega, L-karnitiini võimalik positiivne seos II tüüpi diabeedi ja südame-veresoonkonna haigustega ning γ -butürobetaiini, koliini ja TMAO võimalik positiivne seos neeruhaigustega. Siiski leiti vastupidiselt kirjandusele, et TMAO võib olla II tüüpi diabeedi ja südame-veresoonkonna haigustega seotud negatiivselt. Kuigi valdavas enamikus töödest on

näidatud TMAO sünteesiraja positiivset seost südame-veresoonkonna haiguste ja II tüüpi diabeediga, võivad sellised tulemused olla populatsioonispetsiifilised. Lähtuvalt Soome populatsiooni ajaloost on see rikastatud spetsiifiliste geenivariantidega, mistõttu erineb see suuresti teistest Euroopa populatsioonidest. Lisaks on võimalik, et erinevused kirjandusega on soospetsiifilised, sest hiirtes on näidatud, et *FMO3* geeni ekspressiooni reguleerivad ka suguhormoonid ning TMAO kontsentratsioon erineb emastel ja isastel (Bennett *et al.*, 2013). Kuigi TMAO taset pole seni meestel ja naistel võrreldud, siis on leitud, et vastavalt soole võivad erinevad faktorid mõjutada II tüüpi diabeedi tekkimist (Mahajan *et al.*, 2014).

TMAO moodustub mikroobide vahendatud metabolismi käigus, mistõttu sõltub TMAO kontsentratsioon suuresti soolestiku mikroobidest, mis on võimelised TMAO sünteesiraja lähteaineid, nagu koliin, L-karnitiin ja γ -butürobetaiin, lagundama TMA-ks (Wang *et al.*, 2011). Sellest tulenevalt analüüsiti järgmiseks, kas käesoleva töö valimis erineb soolestiku mikroobioom sõltuvalt TMAO, koliini, L-karnitiini ja γ -butürobetaiini kontsentratsioonist. Samuti vaadati, kas antud valimi mikroobioomis võib esineda geeniklastreid *cutC/D*, *cntA/B*, *yeaW/X*, mida on varasemalt TMA tootmisega seostatud (Craciun ja Balskus, 2012; Koeth *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014).

Käesolevas töös leiti, et soolestiku mikroobioomi alfa- ja beetamitmekesisus ei erine inimestel sõltuvalt TMAO kontsentratsioonist (joonis 12). Korrelatsioonanalüüsis TMAO sünteesiraja metaboliitide ja bakteritaksonite vahel leiti aga seos mitme taksoniga, mida on varasemalt TMAO või selle sünteesiraja lähteainetega seostatud (tabel 5). Siiski püsis peale mitmest testimist statistiliselt olulisena vaid TMAO negatiivne seos perekonnaga *Flavonifractor* (joonis 13, lisa 5). *Flavonifractor*-i seost TMAO kontsentratsiooniga on näidanud ka Schmedes *et al.*, kuid antud seos oli positiivne (Schmedes *et al.*, 2018). Geeniklastrite ennustamisel *cutC/D* ja *cntA/B* geeniklastreid ei leitud. *YeaW/X* geeniklastri leiti paljudest mikroobidest, kuid Falony *et al.*, on leidunud, et see on bakteritel rohkem konserveerunud ning ilmselt laiema spetsiifikaga (Falony *et al.*, 2015). Kuigi varasemalt on näidatud, et soolestiku mikroobid on TMAO tootmises olulised, siis käesolevas töös tugevaid seoseid TMAO sünteesiraja ja soolestiku mikroobioomi vahel ei täheldatud. On võimalik, et see on tingitud informatsiooni puudusest. 16S rRNA põhjal on võimalik kirjeldada vaid väike osa mikroobioomi varieeruvusest, sest isegi fülogeneetiliselt lähedaste mikroobide metabolism võib erineda suuresti. Seepärast võib tegelikust mikroobioomi varieeruvusest anda parema ülevaate metagenoomika uuring. Lisaks kasutati käesolevas töös referentsipõhist OTU-de klasterdamist, mille käigus võib samuti minna osa olulisest

informatsioonist kaduma, sest 16S rRNA järjestused, millele referentsandmebaasist vastet ei leitud, eemaldati analüüsist.

Käesolevas töös ei ilmnenu TMAO puhul selgeid seoseid prediabeediga ega soolestiku mikroobidega. Bioloogilisi seoseid mõjutavad tihti aga mitmed faktorid, mistõttu vaadeldi lõpetuseks prediabeedi ja soolemikroobide koosmõju TMAO kontsentratsioonile. Selle käigus leiti, et *Coriobacteraceae* sugukonda kuuluva tundmatu bakteriperekonna sagedus mõjutab TMAO taset tervetel ja prediabeetikutel erinevalt, juhul kui võrdlusesse kaasati inimesed, kellele antud bakteriperekonda esines. Kuigi leitud seos oli statistiliselt oluline, on jooniselt 14 näha, et tervete ja haigete indiviidide bakterisageduse ja TMAO kontsentratsiooni erinevus on väike.

Kokkuvõtvalt leiti käesolevas töös, et TMAO on tugevalt seotud neeruhaigustele viitavate biomarkeritega, andes põhjust arvata, et see võib olla sobilik biomarker neeruprobleemide tuvastamiseks. Lisaks leiti negatiivne seos vererõhu mõõtude ning triglütseriidide tasemega, mis võib viidata TMAO negatiivsele seosele südame-veresoonkonna haigustega. II tüüpi diabeedi puhul leiti, et seos TMAO-ga ei ole päris selge, kuid kui seos esineb on see pigem negatiivne. TMAO sünteesiraja lähteainetest leiti L-karnitiinil tugev seos ülekaalulisusele, südame-veresoonkonna haigustele ja II tüüpi diabeedile viitavate biomarkeritega ning γ -butürobetaiinil ja koliinil sarnaselt TMAO-le tugev seos neeruhaigustele viitavate biomarkeritega.

Kokkuvõte

TMAO on bakterite vahendatud ainevahetuse käigus moodustuv metaboliit, mida peetakse uueks võimalikuks biomarkeriks südame-veresoonkonna, ainevahetus- ja neeruhaiguste ennetamisel ning potentsiaalseks soolestiku mikrobiomile suunatud sihtmärgiks nende haiguste ravis. Küll aga on TMAO sünteesiraja seoseid nimetatud haigustega uuritud inimestel siiani vähestes populatsioonides.

Käesolevas töös uuriti TMAO ja selle sünteesiraja lähteainete seost prediabeediga, soolestiku mikroobidega ning südame-veresoonkonna haigustele, rasvumisele, II tüüpi diabeedile ja neeruhaigustele viitavate biomarkeritega Soomes kogutud keskealiste meeste valimis. Saadud tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

- TMAO, γ -butürobetaiin ja koliin on positiivselt seotud neerunäitajatega, mistõttu võivad need olla sobilikud biomarkerid neeruhaiguste tuvastamisel.
- L-karnitiin on tugevalt seotud südame-veresoonkonna haigustele, II tüüpi diabeedile ja ülekaalulisusele viitavate biomarkeritega, mistõttu võib see olla sobilik biomarker nimetatud haiguste ennetaval testmisel.
- Tervete, prediabeetikute ja diabeetikute TMAO sünteesiraja komponentide kontsentratsioonide võrdlemisel leiti, et TMAO ja γ -butürobetaiin tase on madalam diabeetikutel ning L-karnitiini tase kõrgem prediabeetikutel, kuid prediabeedi šansside suhe TMAO ja L-karnitiini seost ei toetanud.
- TMAO kontsentratsioon ei mõjutanud tuvastatud soolestiku mikrobiomi alfa- ja beetamitmekesisust.
- Kõrgenenud TMAO kontsentratsiooniga on negatiivselt seotud perekonna *Flavonifractor* sagedus.
- Tuvastatud soolestiku bakteritel ei nähtud prediabeediga koosmõju TMAO kontsentratsioonile.

Antud tulemustest ilmneb, et TMAO sünteesiraja seos südame-veresoonkonna ja ainevahetushaigustega ei pruugi igas populatsioonis olla nii selge, kui siiani kirjanduses kirjeldatud. Otseste seoste leidmiseks on vajalikud edasised uuringud haigusfenotüüpidega.

Gut bacteria derived metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) and its associations with health indicators in the Finnish population.

Johana Koppel

Resume

The gut microbiome is a complex and metabolically active community that directly influences host phenotypes. A growing body of evidence shows that it contributes significantly to a variety of cardio-metabolic diseases in return for host lifestyle and dietary habits. However, the molecular mechanisms behind it are incompletely understood.

In recent studies the gut microbiome dependent metabolite TMAO has been shown to be a promising modulator between the gut microbiome and host cardiometabolic and renal diseases. It has gained a lot of attention because of its clinical relevance and therapeutic potential in the prevention and treatment of those diseases. Nevertheless, the associations have been shown only in a few populations and there is lack of information about which microbes are essential in this pathway.

The aim of this research was to investigate whether the TMAO pathway associations with cardio-metabolic and renal traits are also present within the cohort of middle-aged Finnish men. As well as, the goal was to find which microbes are essential in the pathway. The findings of this work can be summarized as follows:

- TMAO and its substrates γ -butyrobetaine and choline were positively associated with the biomarkers of kidney disease, which indicates that they could be potential biomarkers in the detection of kidney disease.
- L-carnitine, a substrate in TMAO pathway, were associated with the biomarkers of CVD, T2D and obesity, which indicates, it could be a potential biomarker of those diseases.
- TMAO and γ -butyrobetaine levels were reduced in individuals with T2D. L-carnitine levels were elevated in individuals with preT2D. However, the odds of prediabetes did not support the findings for TMAO and L-carnitine.
- TMAO did not affect the α - and β -diversity of the gut microbiome, though it was negatively associated with the abundance of the family *Flavonifractor*.

- Strong interactions between the gut microbiome and preT2D were not detected on TMAO concentration.

In conclusion, these results indicate that the association between TMAO and cardio-metabolic traits might not be as clear as shown before. Although, further studies with clinical phenotypes in METSIM cohort could provide a direct link between TMAO and host disease phenotypes.

Kasutatud kirjandus

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6: 237ra65-237ra65.
- al-Waiz, M., Mikov, M., Mitchell, S.C., Smith, R.L. (1992). The exogenous origin of trimethylamine in the mouse. *Metabolism.* 41: 135–136.
- American Diabetes Association, A.D. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1: S81-90.
- Anthoni, U., Christophersen, C., Gram, L., Nielsen, N.H., Nielsen, P. (1991). Poisonings from flesh of the Greenland shark *Somniosus microcephalus* may be due to trimethylamine. *Toxicol* 29: 1205–1212.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V, Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 15718–15723.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., *et al.* (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17: 690–703.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57: 289–300.
- Bennett, B.J., Vallim, T.Q. de A., Wang, Z., Shih, D.M., Meng, Y., Gregory, J., Allayee, H., Lee, R., Graham, M., Crooke, R., *et al.* (2013). Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metab.* 17: 49–60.
- Bidulescu, A., Chambless, L.E., Siega-Riz, A.M., Zeisel, S.H., Heiss, G. (2007). Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 7: 20.
- Blander, J.M., Longman, R.S., Iliev, I.D., Sonnenberg, G.F., Artis, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat. Immunol.* 18: 851–860.
- Bremer, J. (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiol. Rev.* 63: 1420–1480.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., *et al.* (2003). The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.* 278: 11312–11319.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7: 335–336.
- Carroll, I.M., Ringel-Kulka, T., Keku, T.O., Chang, Y.-H., Packey, C.D., Sartor, R.B., Ringel, Y. (2011). Molecular analysis of the luminal- and mucosal-associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 301: G799–G807.
- Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in

human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67: 302–307.

Chen, Y., Patel, N.A., Crombie, A., Scrivens, J.H., Murrell, J.C. (2011). Bacterial flavin-containing monooxygenase is trimethylamine monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 17791–17796.

Chiang, J.Y.L. (2013). Bile acid metabolism and signaling. *Compr. Physiol.* 3: 1191–1212.

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42: D633–42.

Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 7617–7621.

Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., Knight, R. (2009). Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* (80-). 326: 1694–1697.

Craciun, S., Balskus, E.P. (2012). Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glyceryl radical enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 21307–21312.

Cummings, J.H. (1983). Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet* (London, England) 1: 1206–1209.

Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221–1227.

De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G. (2014). Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell* 156: 84–96.

DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069–5072.

Dethlefsen, L., Relman, D.A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 4554–4561.

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A. (2008). The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* 6: e280.

Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., Engstrand, L., Jansson, J.K. (2008). Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* 2: 716–727.

Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., Lobley, G.E. (2007). Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1073–1078.

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* (80-). 308: 1635–1638.

- Edgar, R.C. (2010).** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461.
- Falony, G., Vieira-Silva, S., Raes, J. (2015).** Microbiology Meets Big Data: The Case of Gut Microbiota–Derived Trimethylamine. *Annu. Rev. Microbiol.* 69: 305–321.
- Fouhy, F., Clooney, A.G., Stanton, C., Claesson, M.J., Cotter, P.D. (2016).** 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol.* 16: 123.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G. (2000).** Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908: 244–254.
- Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. (2007).** Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 13780–13785.
- Girón de Velasco-Sada, P., Falces-Romero, I., Quiles-Melero, I., García-Perea, A., Mingorance, J. (2018).** Evaluation of two real time PCR assays for the detection of bacterial DNA in amniotic fluid. *J. Microbiol. Methods* 144: 107–110.
- Goodrich, J.K., Davenport, E.R., Beaumont, M., Jackson, M.A., Knight, R., Ober, C., Spector, T.D., Bell, J.T., Clark, A.G., Ley, R.E. (2016).** Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* 19: 731–743.
- Hamady, M., Walker, J.J., Harris, J.K., Gold, N.J., Knight, R. (2008).** Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat. Methods* 5: 235–237.
- Heianza, Y., Ma, W., Manson, J.E., Rexrode, K.M., Qi, L. (2017).** Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *J. Am. Heart Assoc.* 6: e004947.
- Hill, M.O. (1973).** Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54: 427–432.
- Hofmann, A.F., Hagey, L.R. (2014).** Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *J. Lipid Res.* 55: 1553–1595.
- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., *et al.* (2013).** Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155: 1451–1463.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T., Creasy, H.H., Earl, A.M., FitzGerald, M.G., Fulton, R.S., *et al.* (2012).** Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486: 207–214.
- Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, O.B.V., C. (1998).** Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline (National Academies Press (US)).
- 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.

- Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G.M., Marchesi, J.R. (2008).** Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 13580–13585.
- Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O’Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A.L., Madsen, K.L., *et al.* (2016).** Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front. Microbiol.* 7: 459.
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000).** KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28: 27–30.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. (2016).** KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44: D457–D462.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K. (2017).** KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45: D353–D361.
- Kim, M.H., Kang, S.G., Park, J.H., Yanagisawa, M., Kim, C.H. (2013).** Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice. *Gastroenterology* 145: 396–406.e10.
- Koeth, R.A., Wang, Z., Levison, B.S., Buffa, J.A., Org, E., Sheehy, B.T., Britt, E.B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., *et al.* (2013).** Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* 19: 576–585.
- Koeth, R.A., Levison, B.S., Culley, M.K., Buffa, J.A., Wang, Z., Gregory, J.C., Org, E., Wu, Y., Li, L., Smith, J.D., *et al.* (2014).** γ -Butyrobetaine Is a Proatherogenic Intermediate in Gut Microbial Metabolism of L-Carnitine to TMAO. *Cell Metab.* 20: 799–812.
- Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fak, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C.J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R.E., *et al.* (2011).** Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 4592–4598.
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.-E., Kang, D.-W., DiBaise, J.K. (2012).** Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr. Clin. Pract.* 27: 201–214.
- Laakso, M., Kuusisto, J., Stančáková, A., Kuulasmaa, T., Pajukanta, P., Lusi, A.J., Collins, F.S., Mohlke, K.L., Boehnke, M. (2017).** The Metabolic Syndrome in Men study: a resource for studies of metabolic and cardiovascular diseases. *J. Lipid Res.* 58: 481–493.
- Langfelder, P., Horvath, S. (2012).** Fast R Functions for Robust Correlations and Hierarchical Clustering. *J. Stat. Softw.* 46.
- Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepile, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., *et al.* (2013).** Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31: 814–821.
- LeBlanc, J.G., Milani, C., de Giori, G.S., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M. (2013).** Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 160–168.
- Leewenhoek, A. (1684).** An Abstract of a Letter from Mr. Anthony Leewenhoek at Delft, Dated Sep. 17. 1683. Containing Some Microscopical Observations, about Animals in the Scurf of the Teeth, the Substance Call’d Worms in the Nose, the Cuticula Consisting of Scales. *Philos. Trans. R. Soc. London* 14: 568–574.

Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023.

Lin, T.Y., Timasheff, S.N. (1994). Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry* 33: 12695–12701.

Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1197–1208.

Mahajan, A., Go, M.J., Zhang, W., Below, J.E., Gaulton, K.J., Ferreira, T., Horikoshi, M., Johnson, A.D., Ng, M.C.Y., Prokopenko, I., *et al.* (2014). Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat. Genet.* 46: 234–244.

Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E.E., Brochado, A.R., Fernandez, K.C., Dose, H., Mori, H., *et al.* (2018). Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature* 555: 623–628.

Matsuda, M., DeFronzo, R.A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22: 1462–1470.

McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I. (1999). Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1721–1730.

McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6: 610–618.

Miller, T.L., Wolin, M.J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1589–1592.

Missailidis, C., Hällqvist, J., Qureshi, A.R., Barany, P., Heimbürger, O., Lindholm, B., Stenvinkel, P., Bergman, P. (2016). Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease. *PLoS One* 11: e0141738.

Miyazawa, E., Iwabuchi, A., Yoshida, T. (1996). Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutr. Res.* 16: 603–613.

Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D. V, Reyes, J.A., Shah, S.A., LeLeiko, N., Snapper, S.B., *et al.* (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 13: R79.

Mueller, D.M., Allenspach, M., Othman, A., Saely, C.H., Muendlein, A., Vonbank, A., Drexel, H., von Eckardstein, A. (2015). Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. *Atherosclerosis* 243: 638–644.

Nagata, C., Wada, K., Tamura, T., Konishi, K., Kawachi, T., Tsuji, M., Nakamura, K. (2015). Choline and Betaine Intakes Are Not Associated with Cardiovascular Disease Mortality Risk in Japanese Men and Women. *J. Nutr.* 145: 1787–1792.

Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.-Z., Abe, F.,

- Osawa, R. (2016).** Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 16: 90.
- Org, E., Blum, Y., Kasela, S., Mehrabian, M., Kuusisto, J., Kangas, A.J., Soininen, P., Wang, Z., Ala-Korpela, M., Hazen, S.L., et al. (2017).** Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol.* 18: 70.
- Pace, N.R. (1997).** A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734–740.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. (1986).** *The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences.* (Springer, Boston, MA), pp. 1–55.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O. (2007).** Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* 5: e177.
- Paul, H.S., Sekas, G., Adibi, S.A. (1992).** Carnitine biosynthesis in hepatic peroxisomes. Demonstration of gamma-butyrobetaine hydroxylase activity. *Eur. J. Biochem.* 203: 599–605.
- Van de Peer, Y., Chapelle, S., De Wachter, R. (1996).** A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 3381–3391.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010).** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012).** A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490: 55–60.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2012).** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41: D590–D596.
- Quigley, E.M.M. (2013).** Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)* 9: 560–569.
- Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O’Connor, P.M., Whittal, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., Hill, C. (2010).** Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 9352–9357.
- Rebouche, C.J., Chenard, C.A. (1991).** Metabolic Fate of Dietary Carnitine in Human Adults: Identification and Quantification of Urinary and Fecal Metabolites. *J. Nutr.* 121: 539–546.
- Rebouche, C.J., Engel, A.G. (1980).** Significance of renal gamma-butyrobetaine hydroxylase for carnitine biosynthesis in man. *J. Biol. Chem.* 255: 8700–8705.
- Rebouche, C.J., Seim, H. (1998).** CARNITINE METABOLISM AND ITS REGULATION IN MICROORGANISMS AND MAMMALS. *Annu. Rev. Nutr.* 18: 39–61.
- Rebouche, C.J., Mack, D.L., Edmonson, P.F. (1984).** L-Carnitine dissimilation in the gastrointestinal tract of the rat. *Biochemistry* 23: 6422–6426.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. (2004).** Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525–552.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Salazar, N. (2016).** Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human

Health. Front. Microbiol. 7: 185.

Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P.I., Godneva, A., Kalka, I.N., Bar, N., et al. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555: 210–215.

Sampson, T.R., Debelius, J.W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G.G., Ilhan, Z.E., Challis, C., Schretter, C.E., Rocha, S., Gradinaru, V., et al. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167: 1469–1480.e12.

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P.A.B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., et al. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.* 30: 350–358.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541.

Schmedes, M., Brejnrod, A.D., Aadland, E.K., Küllerich, P., Kristiansen, K., Jacques, H., Lavigne, C., Graff, I.E., Eng, Ø., Holthe, A., et al. (2018). The Effect of Lean-Seafood and Non-Seafood Diets on Fecal Metabolites and Gut Microbiome: Results from a Randomized Crossover Intervention Study. *Mol. Nutr. Food Res.* 1700976.

Schnorr, S.L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrioni, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini, M., et al. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* 5: 3654.

Schugar, R.C., Shih, D.M., Warriar, M., Helsley, R.N., Burrows, A., Ferguson, D., Brown, A.L., Gromovsky, A.D., Heine, M., Chatterjee, A., et al. (2017). The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Beiging of White Adipose Tissue. *Cell Rep.* 19: 2451–2461.

Schwarz, E., Maukonen, J., Hyytiäinen, T., Kiesepä, T., Orešič, M., Sabunciyan, S., Mantere, O., Saarela, M., Yolken, R., Suvisaari, J. (2018). Analysis of microbiota in first episode psychosis identifies preliminary associations with symptom severity and treatment response. *Schizophr. Res.* 192: 398–403.

Seim, H., Schulze, J., Strack, E. (1985). Catabolic pathways for high-dosed L(-)- or D(+)-carnitine in germ-free rats? *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 366: 1017–1021.

Seldin, M.M., Meng, Y., Qi, H., Zhu, W., Wang, Z., Hazen, S.L., Lusis, A.J., Shih, D.M. (2016). Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B. *J. Am. Heart Assoc.* 5: e002767.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164: 337–340.

Shan, Z., Sun, T., Huang, H., Chen, S., Chen, L., Luo, C., Yang, W., Yang, X., Yao, P., Cheng, J., et al. (2017). Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 106: ajcn157107.

Shimada, K., Sakuma, Y., Wakamatsu, J., Fukushima, M., Sekikawa, M., Kuchida, K., Mikami, M. (2004). Species and muscle differences in L-carnitine levels in skeletal muscles based on a new simple assay. *Meat Sci.* 68: 357–362.

Smits, S.A., Leach, J., Sonnenburg, E.D., Gonzalez, C.G., Lichtman, J.S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Chagalucha, J., Elias, J.E., *et al.* (2017). Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science* 357: 802–806.

Sogin, S.J., Sogin, M.L., Woese, C.R. (1972). Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *J. Mol. Evol.* 1: 173–184.

Son, J.S., Zheng, L.J., Rowehl, L.M., Tian, X., Zhang, Y., Zhu, W., Litcher-Kelly, L., Gadow, K.D., Gathungu, G., Robertson, C.E., *et al.* (2015). Comparison of Fecal Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorders and Neurotypical Siblings in the Simons Simplex Collection. *PLoS One* 10: e0137725.

Song, H.J., Shim, K.-N., Jung, S.-A., Choi, H.J., Lee, M.A., Ryu, K.H., Kim, S.-E., Yoo, K. (2008). Antibiotic-associated diarrhea: candidate organisms other than *Clostridium difficile*. *Korean J. Intern. Med.* 23: 9–15.

Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.-H., Westover, B.P., Weatherford, J., Buhler, J.D., Gordon, J.I. (2005). Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *Science* (80-.). 307: 1955–1959.

Sridharan, G. V., Choi, K., Klemashevich, C., Wu, C., Prabakaran, D., Pan, L. Bin, Steinmeyer, S., Mueller, C., Yousofshahi, M., Alaniz, R.C., *et al.* (2014). Prediction and quantification of bioactive microbiota metabolites in the mouse gut. *Nat. Commun.* 5: 5492.

Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., Macia, L. (2014). The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Adv. Immunol.* 121: 91–119.

Tang, W.H.W., Hazen, S.L. (2014). The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 124: 4204–4211.

Tang, W.H.W., Wang, Z., Kennedy, D.J., Wu, Y., Buffa, J.A., Agatista-Boyle, B., Li, X.S., Levison, B.S., Hazen, S.L. (2015). Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ. Res.* 116: 448–455.

Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D.L.E., Nalin, R., *et al.* (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 11: 2574–2584.

Thangaraju, M., Cresci, G.A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J.P., Browning, D.D., Mellinger, J.D., Smith, S.B., Digby, G.J., Lambert, N.A., *et al.* (2009). GPR109A Is a G-protein-Coupled Receptor for the Bacterial Fermentation Product Butyrate and Functions as a Tumor Suppressor in Colon. *Cancer Res.* 69: 2826–2832.

Tilg, H. (2010). Obesity, Metabolic Syndrome, and Microbiota. *J. Clin. Gastroenterol.* 44: S16–S18.

Treacy, E., Akerman, B.R., Chow, L.M.L., Youil, R., Lin, C.B.J., Bruce, A.G., Knight, M., Danks, D.M., Cashman, J.R., Forrest, S.M. (1998). Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum. Mol. Genet.* 7: 839–845.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027–1131.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I. (2007).** The Human Microbiome Project. *Nature* 449: 804–810.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., *et al.* (2009).** A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457: 480–484.
- Vance, D.E., Li, Z., Jacobs, R.L. (2007).** Hepatic Phosphatidylethanolamine *N* - Methyltransferase, Unexpected Roles in Animal Biochemistry and Physiology. *J. Biol. Chem.* 282: 33237–33241.
- Vaz, F.M., Wanders, R.J.A. (2002).** Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 361: 417–429.
- Vaz, F.M., van Gool, S., Ofman, R., Ijlst, L., Wanders, R.J.A. (1998).** Carnitine Biosynthesis: Identification of the cDNA Encoding Human γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250: 506–510.
- Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., *et al.* (2011).** Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 5: 220–230.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B.J., Koeth, R., Levison, B.S., DuGar, B., Feldstein, A.E., Britt, E.B., Fu, X., Chung, Y.-M., *et al.* (2011).** Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472: 57–63.
- Wetterstrand, K.A. (2016).** DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Large-Scale Genome Sequencing Program.
- Whittaker, R.H. (1972).** Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon* 21: 213.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221–271.
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5088–5090.
- Yamashiro, K., Tanaka, R., Urabe, T., Ueno, Y., Yamashiro, Y., Nomoto, K., Takahashi, T., Tsuji, H., Asahara, T., Hattori, N. (2017).** Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. *PLoS One* 12: e0171521.
- Yancey, P.H. (2005).** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208: 2819–2830.
- Yancey, P.H., Siebenaller, J.F. (1999).** Trimethylamine oxide stabilizes teleost and mammalian lactate dehydrogenases against inactivation by hydrostatic pressure and trypsinolysis. *J. Exp. Biol.* 202: 3597–3603.
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., *et al.* (2012).** Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222–227.
- Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigné, C., Rayssiguier, Y., Rémésy, C. (2001).** Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br. J. Nutr.* 86: 479–485.
- Young, V.B., Schmidt, T.M. (2004).** Antibiotic-associated diarrhea accompanied by large-scale alterations in the composition of the fecal microbiota. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1203–1206.

Zeisel, S.H., da Costa, K.-A. (2009). Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr. Rev.* 67: 615–623.

Zhang, L.S., Davies, S.S. (2016). Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med.* 8: 46.

Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., et al. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol. Psychiatry* 21: 786–796.

Zhu, W., Gregory, J.C., Org, E., Buffa, J.A., Gupta, N., Wang, Z., Li, L., Fu, X., Wu, Y., Mehrabian, M., et al. (2016). Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* 165: 111–124.

Zhu, Y., Jameson, E., Crosatti, M., Schäfer, H., Rajakumar, K., Bugg, T.D.H., Chen, Y. (2014). Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 4268–4273.

Kasutatud veebilehed

¹ <https://www.merriam-webster.com/> (kasutatud 20.04.2018)

² National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID= 1145, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1145> (kasutatud 17.04.2018)

³ <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis> (kasutatud 17.05.2018)

Lisad

Lisa 1. Kirjanduses leitud seosed mikroobide ja TMAO raja komponentide vahel (Koeth *et al.*, 2013, 2014; Schmedes *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2011).

Organism	Takson	Metaboliit	Seos
Hiir	RF39	TMAO	+
	<i>Lachnospiraceae</i>	γ BB, TMAO	-
	<i>Porphyromonadaceae</i>	TMAO	-
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	TMAO	+
	<i>Prevotella</i>	TMAO	+
	<i>Parasutterella</i>	γ BB	+
	<i>Bacteroides</i>	γ BB	+
	<i>Anaeroplasma</i>	TMAO	+
	Tundmatu <i>Ruminococcaceae</i>	TMAO	+
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	TMAO	+
Inimene	<i>Clostridiaceae</i>	TMAO	-
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	TMAO	-
	<i>Prevotella</i>	TMAO	+
	<i>Clostridium</i>	TMAO	-
	<i>Fusibacter</i>	TMAO	+
	<i>Lachnospira</i>	TMAO	-
	Tundmatu <i>Peptostreptococcaceae</i>	TMAO	-
	<i>Sporobacter</i>	TMAO	+
	<i>Oscillibacter</i>	TMAO	+
	<i>Clostridium</i> klaster XVIII	TMAO	+
	<i>Holdemania</i>	TMAO	+
	<i>Subdoligranulum</i>	TMAO	+
	<i>Bilophila</i>	TMAO	+
	<i>Faecalibacterium</i>	TMAO	+
	<i>Butyricoccus</i>	TMAO	+
	<i>Clostridium</i> klaster XIVa	TMAO	+
	<i>Flavonifractor</i>	TMAO	+
<i>Clostridium</i> klaster IV	TMAO	-	
<i>Ruminococcus</i>	TMAO	+	

„+“ positiivne ja „-“ negatiivne seos taksoni ja metaboliidi vahel

Lisa 2. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO ning ülekaalulisusele, II tüüpi diabeedile, südame-veresoonkonna haigustele ja neeruhaigustele viitavate biomarkerite vahelise korrelatsioonanalüüsi tulemused. Tabelis esitatud korrelatsioonikoefitsent, P-väärtus ja mitmese testimise tulemusel saadud FDR väärtus on arvatud vastavalt peatükis „Materjal ja meetodika“ kirjeldatule.

Metaboliit	Biomarker	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR	
γBB	Rasva %	0.064429	0.01461	0.037568	
	KMI	0.018265	0.489032	0.607075	
	WHR	0.000757	0.977115	0.990878	
	GHbA1c	-0.05627	0.076184	0.133786	
	Glc0	-0.06318	0.016569	0.041137	
	Glc120	-0.0514	0.05142	0.09496	
	Ins0	-0.00547	0.835768	0.911747	
	Ins120	5.02E-05	0.998483	0.998483	
	Matsuda	0.057086	0.072595	0.13067	
	Üldkolesterool	-0.03554	0.262941	0.394411	
	LDL	0.00098	0.975393	0.990878	
	HDL	-0.0253	0.425557	0.537546	
	TG	-0.02694	0.307473	0.442761	
	CRP	-0.05085	0.109259	0.185215	
	Süstoolne VR	-0.02112	0.423489	0.537546	
	Diastoolne VR	-0.07717	0.003411	0.010232	
	Kreatiniin	0.407626	4.45E-41	3.20E-39	
	GFR	-0.39569	1.33E-38	4.80E-37	
	Koliin	Rasva %	0.254214	1.07E-19	1.54E-18
		KMI	0.116488	3.98E-05	0.000151
WHR		0.208742	1.18E-13	9.44E-13	
GHbA1c		0.069065	0.051437	0.09496	
Glc0		0.000859	0.975911	0.990878	
Glc120		0.006972	0.806412	0.893257	
Ins0		0.089236	0.001673	0.005475	
Ins120		0.025158	0.376849	0.511946	
Matsuda		0.048867	0.169477	0.266592	
Üldkolesterool		0.032667	0.357342	0.494782	
LDL		-0.0162	0.648365	0.765283	
HDL		0.08274	0.019558	0.04694	
TG		0.064043	0.024234	0.053764	
CRP		0.048678	0.170323	0.266592	
Süstoolne VR		0.027708	0.329803	0.465604	

Lisa 2 jätk.

Metaboliit	Biomarker	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR	
Koliin	Diastoolne VR	-0.07818	0.005899	0.016989	
	Kreatiniin	0.220266	3.34E-10	2.19E-09	
	GFR	-0.23677	1.32E-11	9.54E-11	
L-karnitiin	Rasva %	0.267214	6.94E-25	1.67E-23	
	KMI	0.212011	4.68E-16	4.21E-15	
	WHR	0.254189	1.30E-22	2.35E-21	
	GHbA1c	0.071269	0.024642	0.053764	
	Glc0	0.11957	5.49E-06	2.20E-05	
	Glc120	0.07831	0.002983	0.009337	
	Ins0	0.213277	3.11E-16	3.19E-15	
	Ins120	0.145075	3.43E-08	1.90E-07	
	Matsuda	-0.16736	1.18E-07	5.66E-07	
	Üldkolesterool	0.12657	6.29E-05	0.000216	
	LDL	0.070035	0.027323	0.056207	
	HDL	-0.06491	0.04076	0.081521	
	TG	0.222727	1.34E-17	1.61E-16	
	CRP	0.155197	8.91E-07	4.01E-06	
	Süstoolne VR	0.067054	0.011006	0.030478	
	Diastoolne VR	0.012582	0.633689	0.760427	
	Kreatiniin	-0.00093	0.976749	0.990878	
	GFR	-0.0121	0.703173	0.816588	
	TMAO	Rasva %	0.123015	3.10E-06	1.31E-05
		KMI	0.042208	0.110614	0.185215
WHR		0.05869	0.026462	0.056036	
GHbA1c		0.008912	0.77942	0.890765	
Glc0		-0.00346	0.895969	0.962833	
Glc120		-0.06117	0.020703	0.048084	
Ins0		0.033951	0.199456	0.305549	
Ins120		-0.02225	0.400857	0.524758	
Matsuda		0.027625	0.386208	0.514944	
Üldkolesterool		-0.03496	0.271742	0.399294	
LDL		-0.00825	0.795508	0.893257	
HDL		-0.0499	0.116599	0.190799	
TG		-0.05339	0.043544	0.084734	
CRP		-0.01579	0.61986	0.75644	
Süstoolne VR		-0.06459	0.014541	0.037568	
Diastoolne VR		-0.1056	6.27E-05	0.000216	
Kreatiniin	0.17339	4.01E-08	2.06E-07		
GFR	-0.18242	7.43E-09	4.46E-08		

Lisa 3. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO kvartiilide šansside suhe esimese kvartiili vastu. P-väärtus on arvatud vastavalt peatükis „Materjal ja meetodika“ kirjeldatule.

Metaboliit	Kvartiil	OR	Alumine UI95	Ülemine UI95	P-väärtus
γBB	Q2	0.7455	0.5315	1.0428	0.0874
	Q3	0.6612	0.4716	0.9241	0.0158
	Q4	0.6620	0.4731	0.9230	0.0155
Koliin	Q2	1.3106	0.9225	1.8652	0.1320
	Q3	0.9923	0.7047	1.3968	0.9650
	Q4	0.9513	0.6975	1.2942	0.7510
L-karnitiin	Q2	1.3076	0.9532	1.7959	0.0967
	Q3	1.3594	0.9872	1.8745	0.0604
	Q4	1.2601	0.9101	1.7463	0.1641
TMAO	Q2	0.8171	0.5853	1.1387	0.2338
	Q3	0.5298	0.3810	0.7339	0.0001
	Q4	0.8544	0.6114	1.1921	0.3552

OR – šansside suhte keskvärtus, UI95 – 95% usaldusintervall.

Lisa 4. Valimi soolestiku mikrobiomis esinenud mikroobide keskmine sagedus ja standardhälve. Esitatud on mikroobid, mis leidusid >50% indiviididest.

Hõimkond	Keskmine sagedus	SD	Perekond	Keskmine sagedus	SD
<i>Actinobacteria</i>	0.0204	0.0361	<i>Bifidobacterium</i>	0.0155	0.0334
<i>Bacteroidetes</i>	0.3770	0.1548	<i>Gardnerella</i>	0.0003	0.0008
<i>Firmicutes</i>	0.5654	0.1570	<i>Asaccharobacter</i>	0.0003	0.0011
<i>Proteobacteria</i>	0.0239	0.0524	<i>Collinsella</i>	0.0025	0.0027
<i>Verrucomicrobia</i>	0.0132	0.0324	<i>Coriobacteriaceae;</i> kultiveerimata	0.0018	0.0043
			<i>Bacteroides</i>	0.2582	0.1439
Klass			<i>Barnesiella</i>	0.0095	0.0174
<i>Actinobacteria</i>	0.0158	0.0342	<i>Odoribacter</i>	0.0017	0.0019
<i>Coriobacteriia</i>	0.0046	0.0056	<i>Parabacteroides</i>	0.0169	0.0209
<i>Bacteroidia</i>	0.3747	0.1547	<i>Porphyromonadaceae;</i> kultiveerimata	0.0127	0.0158
<i>Bacteroidetes;</i> VC2.1 Bac22	0.0023	0.0038	<i>Prevotella</i>	0.0246	0.0922
<i>Bacilli</i>	0.0032	0.0088	<i>Alistipes</i>	0.0497	0.0481

Lisa 4 jätk.

Klass	Keskmine sagedus	SD	Perekond	Keskmine sagedus	SD
<i>Clostridia</i>	0.5142	0.1531	<i>Bacteroidales</i> ;S24-7; kultiveerimata	0.0014	0.0009
<i>Erysipelotrichia</i>	0.0105	0.0163	<i>Bacteroidetes</i> ;VC2.1 Bac22;kultiveerimata	0.0023	0.0038
<i>Negativicutes</i>	0.0376	0.0585	<i>Streptococcus</i>	0.0032	0.0088
<i>Betaproteobacteria</i>	0.0067	0.0096	<i>Christensenellaceae</i> ; kultiveerimata	0.0236	0.0372
<i>Deltaproteobacteria</i>	0.0020	0.0030	<i>Clostridiaceae</i> ; <i>Clostridium sensu stricto</i>	0.0104	0.0164
<i>Gammaproteobacteria</i>	0.0152	0.0523	<i>Sarcina</i>	0.0134	0.0200
<i>Verrucomicrobiae</i>	0.0132	0.0324	<i>Defluviitaleaceae</i> ;inc.sed	0.0007	0.0030
			<i>Defluviitaleaceae</i> ; kultiveerimata	0.0001	0.0002
Selts			<i>Clostridiales</i> ; Family XIII;kultiveerimata	0.0014	0.0016
<i>Bifidobacteriales</i>	0.0158	0.0342	<i>Anaerostipes</i>	0.0074	0.0087
<i>Coriobacteriales</i>	0.0046	0.0056	<i>Blautia</i>	0.0217	0.0176
<i>Bacteroidales</i>	0.3747	0.1547	<i>Coprococcus</i>	0.0015	0.0016
<i>Bacteroidetes</i> ;VC2.1 Bac22;kultiveerimata	0.0023	0.0038	<i>Dorea</i>	0.0139	0.0165
<i>Lactobacillales</i>	0.0032	0.0088	<i>Lachnospiraceae</i> ;inc.sed	0.0599	0.0301
<i>Clostridiales</i>	0.5142	0.1531	<i>Lachnospira</i>	0.0049	0.0080
<i>Erysipelotrichales</i>	0.0105	0.0163	<i>Moryella</i>	0.0014	0.0027
<i>Selenomonadales</i>	0.0376	0.0585	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.0391	0.0459
<i>Burkholderiales</i>	0.0067	0.0096	<i>Roseburia</i>	0.0361	0.0325
<i>Desulfovibrionales</i>	0.0020	0.0030	<i>Lachnospiraceae</i> ; kultiveerimata	0.0746	0.0428
<i>Enterobacteriales</i>	0.0131	0.0513	<i>Peptostreptococcaceae</i> ; kultiveerimata	0.0163	0.0204
<i>Pasteurellales</i>	0.0022	0.0105	<i>Anaerotruncus</i>	0.0011	0.0019
<i>Verrucomicrobiales</i>	0.0132	0.0324	<i>Faecalibacterium</i>	0.0479	0.0356
			<i>Flavonifractor</i>	0.0009	0.0022

Lisa 4 jätk.

Klass	Keskmine sagedus	SD	Perekond	Keskmine sagedus	SD
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.0158	0.0342	<i>Ruminococcaceae;inc.sed</i>	0.0195	0.0160
<i>Coriobacteriaceae</i>	0.0046	0.0056	<i>Oscillibacter</i>	0.0005	0.0007
<i>Bacteroidaceae</i>	0.2582	0.1439	<i>Ruminococcus</i>	0.0193	0.0183
<i>Porphyromonadaceae</i>	0.0408	0.0328	<i>Subdoligranulum</i>	0.0300	0.0305
<i>Prevotellaceae</i>	0.0246	0.0922	<i>Ruminococcaceae;</i> kultiveerimata	0.0687	0.0431
<i>Rikenellaceae</i>	0.0497	0.0481	<i>Holdemania</i>	0.0004	0.0006
<i>Bacteroidales;S24-7</i>	0.0014	0.0009	<i>Turicibacter</i>	0.0009	0.0027
<i>Bacteroidetes;VC2.1</i> Bac22;kultiveerimata	0.0023	0.0038	<i>Erysipelotrichaceae;</i> kultiveerimata	0.0093	0.0161
<i>Streptococcaceae</i>	0.0032	0.0088	<i>Dialister</i>	0.0366	0.0585
<i>Christensenellaceae</i>	0.0236	0.0372	<i>Selenomonas</i>	0.0010	0.0031
<i>Clostridiaceae</i>	0.0238	0.0268	<i>Parasutterella</i>	0.0037	0.0078
<i>Defluviitaleaceae</i>	0.0008	0.0030	<i>Sutterella</i>	0.0031	0.0067
<i>Clostridiales;Family XIII</i>	0.0014	0.0016	<i>Bilophila</i>	0.0020	0.0030
<i>Lachnospiraceae</i>	0.2603	0.1027	<i>Enterobacter</i>	0.0131	0.0513
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.0163	0.0204	<i>Haemophilus</i>	0.0022	0.0105
<i>Ruminococcaceae</i>	0.1879	0.0757	<i>Akkermansia</i>	0.0132	0.0324
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.0105	0.0163			
<i>Veillonellaceae</i>	0.0376	0.0585			
<i>Alcaligenaceae</i>	0.0067	0.0096			
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.0020	0.0030			
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.0131	0.0513			
<i>Pasteurellaceae</i>	0.0022	0.0105			
<i>Verrucomicrobiaceae</i>	0.0132	0.0324			

Lisa 5. γ -butürobetaiini, koliini, L-karnitiini ja TMAO ning andmestikus leiduvate bakteritaksonite vahelise korrelatsioonanalüüsi tulemused. Tabelis esitatud korrelatsioonikoefitsent, P-väärtus ja mitmese testimise tulemusel saadud FDR väärtus on arvutatud vastavalt peatükis „Materjal ja meetodika“ kirjeldatule

Metaboliit	Takson	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR
γ BB	<i>Actinobacteria</i>	-0.021	0.6274	0.9457
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	-0.038	0.3834	0.7746
	<i>Bifidobacterium</i>	-0.038	0.3789	0.7746
	<i>Gardnerella</i>	-0.044	0.308	0.7746
	<i>Coriobacteriaceae</i>	-0.002	0.9559	0.9962
	<i>Asaccharobacter</i>	-0.003	0.9441	0.9962
	<i>Collinsella</i>	0.0252	0.5618	0.9021
	<i>Coriobacteriaceae</i> tundmatu	-0.05	0.2513	0.7683
	<i>Bacteroidetes</i>	0.0204	0.6392	0.9503
	<i>Bacteroidales</i>	0.0223	0.6081	0.9367
	<i>Bacteroides</i>	-0.035	0.4262	0.805
	<i>Porphyromonadaceae</i>	-0.03	0.4905	0.8608
	<i>Barnesiella</i>	0.0408	0.3486	0.7746
	<i>Odoribacter</i>	0.0268	0.5378	0.896
	<i>Parabacteroides</i>	0.006	0.8895	0.9892
	<i>Porphyromonadaceae</i> tundmatu	-0.028	0.5139	0.8793
	<i>Prevotella</i>	0.0675	0.1201	0.5663
	<i>Alistipes</i>	-0.001	0.9752	0.9997
	<i>Bacteroidales</i> perekond S24_7 tundmatu	-0.073	0.0947	0.5554
	<i>Bacteroidetes</i> klass VC2_1_Bac22 tundmatu	-0.071	0.103	0.5554
	<i>Firmicutes</i>	-0.085	0.0505	0.5517
	<i>Streptococcus</i>	-0.005	0.9125	0.9892
	<i>Clostridiales</i>	-0.085	0.0495	0.5517
	<i>Christensenellaceae</i> tundmatu	0.0463	0.2874	0.7746
	<i>Clostridiaceae</i>	0.1185	0.0063	0.4264
	<i>Clostridiaceae Clostridium sensu stricto</i>	0.0369	0.3957	0.7746
	<i>Sarcina</i>	0.0602	0.1659	0.6183
	<i>Defluviitaleaceae</i>	0.0511	0.2397	0.7583
	<i>Defluviitaleaceae Inc. sed</i>	-0.003	0.9451	0.9962
	<i>Defluviitaleaceae</i> tundmatu	0.0652	0.1332	0.5663
	<i>Clostridiales</i> sugukond XIII tundmatu	0.01	0.8181	0.9738
	<i>Lachnospiraceae</i>	-0.074	0.0872	0.5517
	<i>Anaerostipes</i>	-0.053	0.2233	0.723
	<i>Blautia</i>	0.0479	0.2702	0.7746
	<i>Coprococcus</i>	0.0401	0.3563	0.7746
	<i>Dorea</i>	8.40E-05	0.9985	0.9997

Lisa 5 jätk.

Metaboliit	Takson	Korrelaatioi- koefitsent	P-väärtus	FDR
γBB	<i>Lachnospiraceae Inc. sed</i>	-0.07	0.1057	0.5554
	<i>Lachnospira</i>	-0.04	0.3604	0.7746
	<i>Moryella</i>	-0.018	0.6778	0.9561
	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.0545	0.2098	0.7033
	<i>Roseburia</i>	-0.019	0.6632	0.9561
	<i>Lachnospiraceae tundmatu</i>	-0.055	0.2099	0.7033
	<i>Peptostreptococcaceae tundmatu</i>	0.041	0.346	0.7746
	<i>Ruminococcaceae</i>	-0.064	0.1386	0.5799
	<i>Anaerotruncus</i>	0.0804	0.064	0.5517
	<i>Faecalibacterium</i>	-0.031	0.4751	0.8608
	<i>Flavonifractor</i>	-0.075	0.086	0.5517
	<i>Ruminococcaceae Inc. sed</i>	0.1036	0.0169	0.524
	<i>Oscillibacter</i>	0.0539	0.2146	0.7033
	<i>Ruminococcus</i>	-0.013	0.7619	0.9617
	<i>Subdoligranulum</i>	-0.094	0.031	0.5517
	<i>Ruminococcaceae tundmatu</i>	-0.026	0.5501	0.896
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	-0.005	0.9142	0.9892
	<i>Holdemania</i>	0.0134	0.7577	0.9617
	<i>Turcibacter</i>	-0.066	0.1277	0.5663
	<i>Erysipelotrichaceae tundmatu</i>	0.0047	0.9145	0.9892
	<i>Veillonellaceae</i>	-0.013	0.7707	0.9617
	<i>Dialister</i>	-0.069	0.1132	0.5599
	<i>Selenomonas</i>	0.0753	0.0831	0.5517
	<i>Proteobacteria</i>	0.0624	0.151	0.5998
	<i>Alcaligenaceae</i>	0.0065	0.8811	0.9892
	<i>Parasutterella</i>	-0.058	0.1796	0.66
	<i>Sutterella</i>	0.0174	0.6894	0.9561
	<i>Bilophila</i>	0.0174	0.6895	0.9561
	<i>Gammaproteobacteria</i>	-0.03	0.4886	0.8608
	<i>Enterobacter</i>	-0.013	0.7697	0.9617
<i>Haemophilus</i>	0.027	0.5346	0.896	
<i>Akkermansia</i>	-0.025	0.5719	0.9021	
Koliin	<i>Actinobacteria</i>	0.0274	0.5292	0.896
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.0791	0.0688	0.5517
	<i>Bifidobacterium</i>	0.0812	0.0618	0.5517
	<i>Gardnerella</i>	0.0057	0.8957	0.9892
	<i>Coriobacteriaceae</i>	-0.051	0.2428	0.7592
	<i>Asaccharobacter</i>	0.0009	0.9826	0.9997
	<i>Collinsella</i>	-0.019	0.6578	0.9561
	<i>Coriobacteriaceae tundmatu</i>	-0.031	0.4743	0.8608

Lisa 5 jätk.

Metaboliit	Takson	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR
Koliin	<i>Bacteroidetes</i>	-0.038	0.3809	0.7746
	<i>Bacteroidales</i>	-0.037	0.3916	0.7746
	<i>Bacteroides</i>	-0.07	0.1089	0.5554
	<i>Porphyromonadaceae</i>	-0.054	0.2131	0.7033
	<i>Barnesiella</i>	0.0776	0.0744	0.5517
	<i>Odoribacter</i>	-0.046	0.2942	0.7746
	<i>Parabacteroides</i>	-0.071	0.1016	0.5554
	<i>Porphyromonadaceae</i> tundmatu	-0.015	0.7233	0.9617
	<i>Prevotella</i>	0.0111	0.7983	0.9651
	<i>Alistipes</i>	-0.07	0.1058	0.5554
	<i>Bacteroidales</i> perekond S24_7 tundmatu	-0.014	0.7409	0.9617
	<i>Bacteroidetes</i> klass VC2_1_Bac22 tundmatu	-0.017	0.6883	0.9561
	<i>Firmicutes</i>	0.0225	0.6053	0.9367
	<i>Streptococcus</i>	-0.038	0.3849	0.7746
	<i>Clostridiales</i>	-8.22E-05	0.9985	0.9997
	<i>Christensenellaceae</i> tundmatu	-0.004	0.9309	0.9962
	<i>Clostridiaceae</i>	0.046	0.2908	0.7746
	<i>Clostridiaceae Clostridium sensu stricto</i>	-0.014	0.7416	0.9617
	<i>Sarcina</i>	0.0518	0.2338	0.7481
	<i>Defluviitaleaceae</i>	-0.013	0.7662	0.9617
	<i>Defluviitaleaceae Inc. sed</i>	-0.037	0.3929	0.7746
	<i>Defluviitaleaceae</i> tundmatu	0.0384	0.3778	0.7746
	<i>Clostridiales</i> sugukond XIII tundmatu	0.0018	0.967	0.9963
	<i>Lachnospiraceae</i>	-0.048	0.2744	0.7746
	<i>Anaerostipes</i>	0.0204	0.6393	0.9503
	<i>Blautia</i>	0.0046	0.9164	0.9892
	<i>Coprococcus</i>	0.012	0.7832	0.9651
	<i>Dorea</i>	-0.005	0.9031	0.9892
	<i>Lachnospiraceae Inc. sed</i>	0.0575	0.1862	0.6693
	<i>Lachnospira</i>	-0.005	0.9124	0.9892
	<i>Moryella</i>	-0.057	0.1919	0.6693
	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.0837	0.0541	0.5517
	<i>Roseburia</i>	-0.065	0.1324	0.5663
	<i>Lachnospiraceae</i> tundmatu	-0.049	0.2647	0.7746
	<i>Peptostreptococcaceae</i> tundmatu	0.0331	0.4473	0.8392
	<i>Ruminococcaceae</i>	0.0428	0.3258	0.7746
	<i>Anaerotruncus</i>	0.1348	0.0019	0.2402
	<i>Faecalibacterium</i>	-0.013	0.7676	0.9617
	<i>Flavonifractor</i>	-0.04	0.3589	0.7746
	<i>Ruminococcaceae Inc. sed</i>	0.0406	0.3506	0.7746

Lisa 5 jätk.

Metaboliit	Takson	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR
Koliin	<i>Oscillibacter</i>	-0.037	0.3919	0.7746
	<i>Ruminococcus</i>	0.0302	0.4879	0.8608
	<i>Subdoligranulum</i>	0.0293	0.5015	0.8688
	<i>Ruminococcaceae</i> tundmatu	0.0612	0.1594	0.6093
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	-0.021	0.6293	0.9457
	<i>Holdemania</i>	-0.066	0.1316	0.5663
	<i>Turcibacter</i>	-0.08	0.0655	0.5517
	<i>Erysipelotrichaceae</i> tundmatu	-0.04	0.3598	0.7746
	<i>Veillonellaceae</i>	0.0266	0.5415	0.896
	<i>Dialister</i>	0.0451	0.2995	0.7746
	<i>Selenomonas</i>	-0.016	0.71	0.9561
	<i>Proteobacteria</i>	0.0302	0.4885	0.8608
	<i>Alcaligenaceae</i>	-0.03	0.4857	0.8608
	<i>Parasutterella</i>	-0.018	0.683	0.9561
	<i>Sutterella</i>	-0.043	0.3189	0.7746
	<i>Bilophila</i>	-0.005	0.9082	0.9892
	<i>Gammaproteobacteria</i>	-0.069	0.1103	0.5554
	<i>Enterobacter</i>	-0.006	0.886	0.9892
	<i>Haemophilus</i>	-0.041	0.3477	0.7746
	<i>Akkermansia</i>	0.044	0.312	0.7746
L-karnitiin	<i>Actinobacteria</i>	-0.032	0.4659	0.8608
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	-0.044	0.3155	0.7746
	<i>Bifidobacterium</i>	-0.044	0.3172	0.7746
	<i>Gardnerella</i>	-0.013	0.761	0.9617
	<i>Coriobacteriaceae</i>	-0.022	0.613	0.9367
	<i>Asaccharobacter</i>	0.0006	0.9893	0.9997
	<i>Collinsella</i>	0.0099	0.8199	0.9738
	<i>Coriobacteriaceae</i> tundmatu	-0.049	0.2643	0.7746
	<i>Bacteroidetes</i>	0.0865	0.0465	0.5517
	<i>Bacteroidales</i>	0.0868	0.0458	0.5517
	<i>Bacteroides</i>	0.0573	0.1877	0.6693
	<i>Porphyromonadaceae</i>	0.0163	0.7078	0.9561
	<i>Barnesiella</i>	-0.003	0.9521	0.9962
	<i>Odoribacter</i>	-0.061	0.1613	0.6093
	<i>Parabacteroides</i>	0.0431	0.3225	0.7746
	<i>Porphyromonadaceae</i> tundmatu	-0.008	0.856	0.9892
	<i>Prevotella</i>	0.0062	0.8861	0.9892
	<i>Alistipes</i>	-0.016	0.7088	0.9561
	<i>Bacteroidales</i> perekond S24_7 tundmatu	0.0354	0.416	0.7968
	<i>Bacteroidetes</i> klass VC2_1_Bac22 tundmatu	-0.035	0.4223	0.8033

Lisa 5 jätk.

Metaboliit	Takson	Korrelaatioi- koefitsent	P-väärtus	FDR
L-karnitiin	<i>Firmicutes</i>	-0.088	0.0437	0.5517
	<i>Streptococcus</i>	-0.045	0.2958	0.7746
	<i>Clostridiales</i>	-0.081	0.0635	0.5517
	<i>Christensenellaceae</i> tundmatu	-0.09	0.0386	0.5517
	<i>Clostridiaceae</i>	-0.047	0.2837	0.7746
	<i>Clostridiaceae Clostridium sensu stricto</i>	0.0245	0.5738	0.9021
	<i>Sarcina</i>	-0.076	0.0789	0.5517
	<i>Defluviitaleaceae</i>	0.0661	0.1285	0.5663
	<i>Defluviitaleaceae Inc. sed</i>	0.0467	0.283	0.7746
	<i>Defluviitaleaceae</i> tundmatu	0.0313	0.4715	0.8608
	<i>Clostridiales</i> sugukond XIII tundmatu	-0.022	0.6126	0.9367
	<i>Lachnospiraceae</i>	-0.042	0.3363	0.7746
	<i>Anaerostipes</i>	0.0058	0.8931	0.9892
	<i>Blautia</i>	0.0031	0.9438	0.9962
	<i>Coprococcus</i>	-0.013	0.7638	0.9617
	<i>Dorea</i>	0.0113	0.7951	0.9651
	<i>Lachnospiraceae Inc. sed</i>	0.0053	0.9029	0.9892
	<i>Lachnospira</i>	-0.112	0.0098	0.524
	<i>Moryella</i>	-0.028	0.514	0.8793
	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.0168	0.6992	0.9561
	<i>Roseburia</i>	-0.003	0.9364	0.9962
	<i>Lachnospiraceae</i> tundmatu	-0.062	0.1559	0.6056
	<i>Peptostreptococcaceae</i> tundmatu	-0.011	0.7961	0.9651
	<i>Ruminococcaceae</i>	5.47E-05	0.999	0.9997
	<i>Anaerotruncus</i>	0.0222	0.6096	0.9367
	<i>Faecalibacterium</i>	-0.017	0.7013	0.9561
	<i>Flavonifractor</i>	0.0777	0.0739	0.5517
	<i>Ruminococcaceae Inc. sed</i>	0.0012	0.9778	0.9997
	<i>Oscillibacter</i>	0.0774	0.075	0.5517
	<i>Ruminococcus</i>	-0.014	0.7395	0.9617
	<i>Subdoligranulum</i>	-0.082	0.0594	0.5517
	<i>Ruminococcaceae</i> tundmatu	0.0634	0.1448	0.5966
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.0248	0.5683	0.9021
<i>Holdemania</i>	0.107	0.0137	0.524	
<i>Turcibacter</i>	-0.068	0.1205	0.5663	
<i>Erysipelotrichaceae</i> tundmatu	0.0428	0.3259	0.7746	
<i>Veillonellaceae</i>	-0.012	0.7912	0.9651	
<i>Dialister</i>	-0.048	0.2748	0.7746	
<i>Selenomonas</i>	0.0085	0.8449	0.9892	
<i>Proteobacteria</i>	-0.075	0.0845	0.5517	

Lisa 5 jätk.

Metaboliit	Takson	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR
L-karnitiin	<i>Alcaligenaceae</i>	-0.062	0.1522	0.5998
	<i>Parasutterella</i>	-0.079	0.0707	0.5517
	<i>Sutterella</i>	0.0249	0.5673	0.9021
	<i>Bilophila</i>	0.0075	0.8634	0.9892
	<i>Gammaproteobacteria</i>	-0.08	0.0673	0.5517
	<i>Enterobacter</i>	0.0294	0.4999	0.8688
	<i>Haemophilus</i>	0.0453	0.2977	0.7746
	<i>Akkermansia</i>	0.0139	0.7504	0.9617
TMAO	<i>Actinobacteria</i>	0.0571	0.1898	0.6693
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.0375	0.3894	0.7746
	<i>Bifidobacterium</i>	0.0375	0.3902	0.7746
	<i>Gardnerella</i>	0.036	0.4092	0.7894
	<i>Coriobacteriaceae</i>	-0.008	0.8579	0.9892
	<i>Asaccharobacter</i>	0.0849	0.0513	0.5517
	<i>Collinsella</i>	0.005	0.9096	0.9892
	<i>Coriobacteriaceae tundmatu</i>	0.018	0.6793	0.9561
	<i>Bacteroidetes</i>	-0.043	0.3207	0.7746
	<i>Bacteroidales</i>	-0.041	0.3432	0.7746
	<i>Bacteroides</i>	-0.073	0.0938	0.5554
	<i>Porphyromonadaceae</i>	-0.037	0.3984	0.7746
	<i>Barnesiella</i>	0.0802	0.0656	0.5517
	<i>Odoribacter</i>	0.0058	0.894	0.9892
	<i>Parabacteroides</i>	-0.049	0.2635	0.7746
	<i>Porphyromonadaceae tundmatu</i>	-0.019	0.6608	0.9561
	<i>Prevotella</i>	0.0655	0.133	0.5663
	<i>Alistipes</i>	0.0137	0.7543	0.9617
	<i>Bacteroidales perekond S24_7 tundmatu</i>	-0.046	0.2868	0.7746
	<i>Bacteroidetes klass VC2_1_Bac22 tundmatu</i>	-0.01	0.8166	0.9738
	<i>Firmicutes</i>	0.0262	0.5487	0.896
	<i>Streptococcus</i>	-0.042	0.3329	0.7746
	<i>Clostridiales</i>	0.0301	0.49	0.8608
	<i>Christensenellaceae tundmatu</i>	0.0707	0.1048	0.5554
	<i>Clostridiaceae</i>	0.1094	0.0119	0.524
	<i>Clostridiaceae Clostridium sensu stricto</i>	-0.017	0.6934	0.9561
	<i>Sarcina</i>	0.1306	0.0026	0.2402
	<i>Defluviitaleaceae</i>	0.05	0.2514	0.7683
	<i>Defluviitaleaceae Inc. sed</i>	-0.003	0.9361	0.9962
	<i>Defluviitaleaceae tundmatu</i>	0.0813	0.062	0.5517
	<i>Clostridiales sugukond XIII tundmatu</i>	0.0763	0.0797	0.5517
	<i>Lachnospiraceae</i>	0.0124	0.7763	0.9641

Lisa 5 jätk.

Metaboliit	Takson	Korrelatsiooni-koefitsent	P-väärtus	FDR
TMAO	<i>Anaerostipes</i>	-1.46E-05	0.9997	0.9997
	<i>Blautia</i>	0.0755	0.083	0.5517
	<i>Coprococcus</i>	0.0914	0.0358	0.5517
	<i>Dorea</i>	0.0181	0.6781	0.9561
	<i>Lachnospiraceae Inc. sed</i>	-0.009	0.8367	0.9892
	<i>Lachnospira</i>	-0.011	0.8023	0.9656
	<i>Moryella</i>	0.0626	0.1509	0.5998
	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0.013	0.7664	0.9617
	<i>Roseburia</i>	0.0261	0.5501	0.896
	<i>Lachnospiraceae tundmatu</i>	-0.018	0.6849	0.9561
	<i>Peptostreptococcaceae tundmatu</i>	0.0214	0.6244	0.9457
	<i>Ruminococcaceae</i>	-0.008	0.8585	0.9892
	<i>Anaerotruncus</i>	0.1032	0.0177	0.524
	<i>Faecalibacterium</i>	-0.067	0.1224	0.5663
	<i>Flavonifractor</i>	-0.152	0.0005	0.1278
	<i>Ruminococcaceae Inc. sed</i>	0.0727	0.0953	0.5554
	<i>Oscillibacter</i>	-0.102	0.0193	0.524
	<i>Ruminococcus</i>	0.0816	0.0609	0.5517
	<i>Subdoligranulum</i>	-0.002	0.9558	0.9962
	<i>Ruminococcaceae tundmatu</i>	0.0886	0.0417	0.5517
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.0368	0.3987	0.7746
	<i>Holdemania</i>	0.0165	0.705	0.9561
	<i>Turicibacter</i>	0.0889	0.0412	0.5517
	<i>Erysipelotrichaceae tundmatu</i>	0.0195	0.6548	0.9561
	<i>Veillonellaceae</i>	0.0397	0.3628	0.7746
	<i>Dialister</i>	0.0265	0.5436	0.896
	<i>Selenomonas</i>	-0.002	0.9638	0.9963
	<i>Proteobacteria</i>	0.0702	0.107	0.5554
	<i>Alcaligenaceae</i>	0.0118	0.7862	0.9651
	<i>Parasutterella</i>	-0.04	0.3579	0.7746
	<i>Sutterella</i>	0.0019	0.9649	0.9963
	<i>Bilophila</i>	-0.055	0.2084	0.7033
	<i>Gammaproteobacteria</i>	0.0441	0.3123	0.7746
	<i>Enterobacter</i>	-0.025	0.5618	0.9021
	<i>Haemophilus</i>	0.0142	0.7452	0.9617
	<i>Akkermansia</i>	-0.007	0.8662	0.9892

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johana Koppel (sünnikuupäev: 23.05.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Soolestiku mikroobide vahendusel moodustuv metaboliit trimetülamiin N-oksiidi (TMAO) ja selle seosed tervisenäitajatega Soome populatsioonis**“,

mille juhendaja on Elin Org,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018