Razlike izražaja gena u mokraćnom mjehuru miševa uzgajanih u sterilnom i standardnom okolišu

Šimić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:192409

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Šimić

RAZLIKE IZRAŽAJA GENA U MOKRAĆNOM MJEHURU MIŠEVA UZGAJANIH U STERILNOM I STANDARDNOM OKOLIŠU

Diplomski rad

Akademska godina:

2018./2019.

Mentor: prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

Split, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Šimić

RAZLIKE IZRAŽAJA GENA U MOKRAĆNOM MJEHURU MIŠEVA UZGAJANIH U STERILNOM I STANDARDNOM OKOLIŠU

Diplomski rad

Akademska godina:

2018./2019.

Mentor: prof. dr. sc. Janoš Terzić, dr. med.

Split, srpanj 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Mikrobiom čovjeka 2

1.2. *The Human microbiome project* 3

1.3. Razvoj mikrobiote i disbioza 4

1.4. Mikrobiota gastrointestinalnog sustava 5

1.5. Povezanost intestinalne mikrobiote i cirkadijanog ritma 6

1.6. Mikrobiota mokraćnog sustava 9

1.7. Germ-free miševi (GF) 11

1.8. Specific-pathogen free miševi (SPF) 14

1.9. Razlike u crijevnoj strukturi i funkciji između GF i SPF miševa 14

2. HIPOTEZA 16

3. ANIMALNI MODELI I METODE 18

3.1. Animalni modeli i uzorci 19

3.2. Postupak izolacije RNA iz tkiva 19

3.3. RNAseq 20

3.4. Sinteza cDNA 23

3.5. Dizajniranje početnica (primera) 25

3.6. Priprema qRT-PCR 26

3.7. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (QRT-PCR) 27

3.8. Obrada podataka 30

4. REZULTATI 32

4.1. Geni izvanstaničnog matriksa 33

4.2. Geni cirkadijanog ciklusa 35

4.3. Mup7 (*major urinary protein 7*) 37

5. RASPRAVA 38

5.1. Geni za proteine izvanstaničnog matriksa 39
5.1.1. Spon2 (*spondin 2*) 39
5.1.2. Lama1 (*laminin subunit alpha 1*) 40
5.1.3. Tnc1 (*tenascin 1*) 40
5.1.4. Cldn1 (*claudin 1*) 40
5.1.5. Col2a1 (*collagen type II alpha 1 chain*) 40
5.1.6. Egfr (*epidermal growth factor receptor*) 40
5.2. Geni cirkadijanog ciklusa 41
5.2.1. Per1, Per2 i Per3 *(period circadian clock)* 42
5.2.2. Nfil3 (*nuclear faktor, interleukin 3 regulated*) 42
5.2.3. Arntl (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1*) ili Bmal1 (*brain and muscle ARNT-like 1*) 43
5.2.4. Tef (*thyrotroph embryonic factor*) 43
5.2.5. Reverbα 44
5.3. Mup7 (*major urinary protein 7*) 44
5.4. Ograničenja provedenog istraživanja 45
6. ZAKLJUČCI 46
7. REFERENCE 48
8. SAŽETAK 62
9. SUMMARY 64
10. ŽIVOTOPIS 66

Zahvaljujem se svome mentoru prof. dr. sc. Janošu Terziću na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu i prenesenom znanju tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se mag. educ. biol. et chem. Blanki Roje na strpljenju, podučavanju, posvećenom vremenu i podršci tijekom prikupljanja podataka i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, posebno roditeljima, Alenki i Ivici, na svemu što su mi omogućili tijekom školovanja i što su vjerovali u mene.

Posebno se zahvaljujem Brunu, prijateljima i kolegama što su mi uljepšali studentske dane, studiranje učinili lakšim i zajednički provedeno vrijeme nezaboravnim.

1. UVOD

1.1. Mikrobiom čovjeka

Svi mikroorganizmi jedne zajednice, zajedno sa svojim genima i molekulama koje proizvode, čine kompleksni mikrobiom te zajednice, dok se termin mikrobiota koristi za sve mikroorganizme (uključivo viruse, bakterije, gljivice i parazite) te zajednice (1). Fiziološku mikrobiotu čovjeka sačinjava varijabilan broj stanica mikroorganizama koji ovisi o ishrani, visini, težini, dobi, etnicitetu, kulturi i okolišu neke osobe. Pretpostavlja se da postoji i značajna razlika u broju ljudskih stanica ovisno o okolišu u kojem pojedinac živi i o njegovoj dobi (2).

Dobro poznati podatak da u ljudskom organizmu ima 10 puta više mikrobnih stanica nego ljudskih (3,4) je izgleda netočan i znanstveno nedovoljno utemeljen (5). Potječe iz 1977. godine iz rada Savage-a (6) koji je broj mikrobnih stanica izračunao prema radu iz 1972. (7) u kojem je Luckey neprecizno procijenio da je u fecesu prisutno 10^{11} bakterija po gramu fecesa, a masa fecesa je oko 1 kg dnevno pa je zaključio da se u crijevima nalazi 10^{14} bakterija. S druge strane, za broj ljudskih stanica korišten u ovom omjeru, uzet je broj od 10^{13} iz prve rečenice knjige Genetics of the evolutionary process (8). Ovaj primjer ukazuje na to kako se netočan podatak može dugo zadržati čak i u znanstvenoj zajednici samo zato što fascinantno zvuči.

Broj bakterijskih i ljudskih stanica koji je bliži istini i temelji se na najnovijim informacijama je $3{,}8 \times 10^{13}$ bakterijskih stanica u čovjeku teškom 70 kg te 3×10^{13} ljudskih stanica. Taj broj ljudskih stanica se temelji na činjenici da 90% ljudskih stanica sačinjavaju hematopoetske stanice. Na temelju tih podataka zaključuje se da je odnos ljudskih naprema bakterijskim stanicama bliži omjeru 1:1. Ali s druge strane, sveukupni genom ljudske mikrobiote brojem gena premašuje ljudski genom i do 100 puta (9-11).

Ovi mikroorganizmi žive kao komenzali u i na ljudskom tijelu te je njihova prisutnost neophodna za održavanje zdravlja i normalan razvoj domaćina (12-14). Svako kolonizirano tjelesno područje ima drukčiji mikrobiom u ovisnosti o metaboličkim specifičnostima pojedinog područja kao što je primjerice dostupnost kisika (15). Mikrobiom svake osobe je jedinstven, različit je čak i u jednojajčanih blizanaca (16), što se jednim dijelom objašnjava razlikama u prehrani, hormonima, okolišu, genetici domaćina, izloženosti toksinima, izloženosti karcinogenima i ranom izlaganju mikrobima, a većim dijelom uzrok različitosti ostaje nerazjašnjen (17). Međutim, postoje veće sličnosti u sastavu mikrobiote među pripadnicima istih rasa, etničkih skupina i srodnih osoba (18).

1.2. *The Human microbiome project*

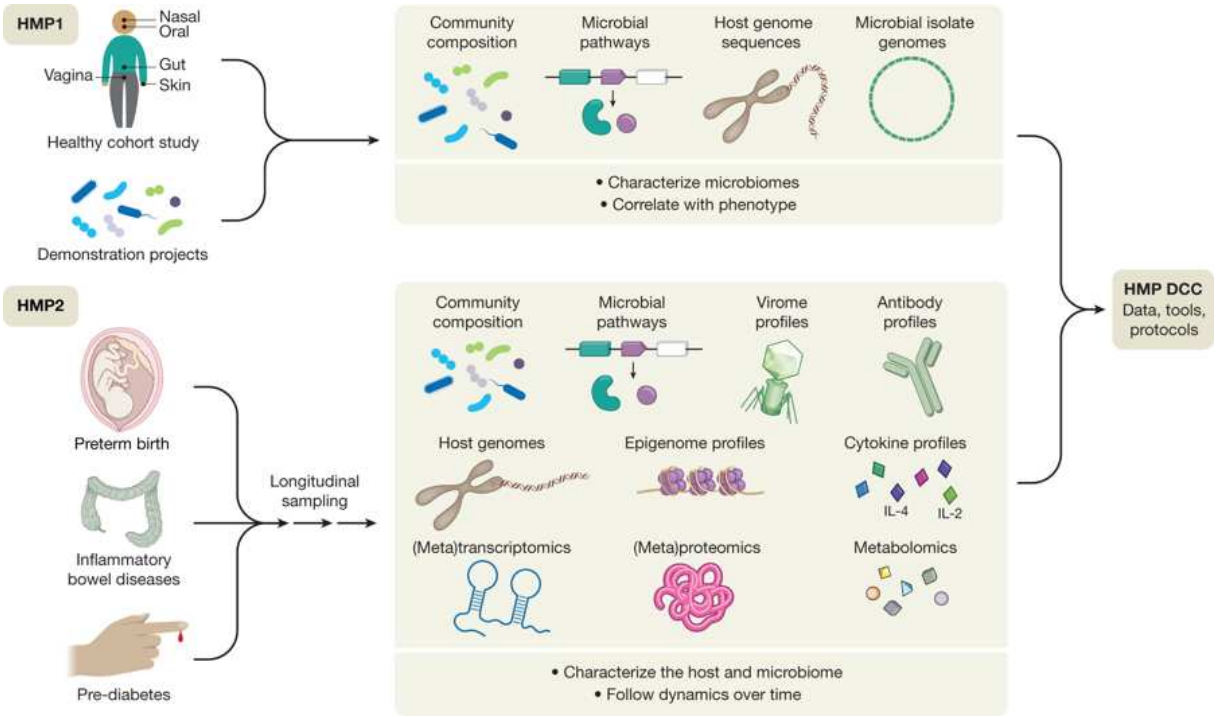
Prvi katalozi bakterijskih gena koji pripadaju ljudskom mikrobiomu proizašli su iz američkog projekta "*The Human Microbiome Project*" HMP (17) i europskog projekta "*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*" (MetaHIT).

Nakon što je 2001.godine sekvencioniran ljudski genom, znanstvenici su shvatili da će ovaj projekt biti nepotpun ako se ne otkriju sinergističke aktivnosti između čovjeka i mikroba koje žive u i na ljudskom tijelu (19). HMP je bio osmišljen tako da omogući razumijevanje učinaka mikrobnih komponenti na naš genetski i metabolički sastav te da utvrdi kako oni pridonose našoj normalnoj fiziologiji i predispoziciji za bolesti (20) što bi se ostvarilo karakteriziranjem mikrobioma zdravih pojedinaca i određivanjem osnovnog mikrobioma, ako on uopće postoji. Krajnji je cilj pokazati da postoje mogućnosti da se poboljša ljudsko zdravlje monitoriranjem ili manipulacijom ljudskog mikrobioma (21).

Početna faza projekta HMP (takozvani HMP1) je u 2008. godini okarakterizirala mikrobne zajednice u 300 zdravih pojedinaca s pet različitih mjesta u ljudskom organizmu: nosni hodnici, usna šupljina, koža, gastrointestinalni sustav i urogenitalni sustav. Za ovo su istraživanje korištene metode metagenomike koje se baziraju na metodama sekvencioniranja mikrobne molekule DNA direktno iz uzoraka uzetih s mjesta njihovog obitavanja. Metode tradicionalne mikrobiologije (uzgoj bakterija na hranjivim podlogama) nisu se mogle koristiti u ovoj vrsti istraživanja zbog toga što se većina mikrobnih vrsta ne može uspješno izolirati i kultivirati za daljnje analize jer je njihov rast ovisan o specifičnom mikrookolišu u kojem žive, a kojega nije moguće uspješno eksperimentalno reproducirati. Za analizu kompleksnosti mikrobnih zajednica korišteno je 16S rRNA sekvencioniranje, dok je cjelogenomsko tzv. *shotgun* sekvencioniranje pružilo potpuniji uvid u funkciju i metaboličke puteve prisutne u ljudskom mikrobiomu. Mapiranje mikrobioma i mjerenje količine različitih mikrobnih vrsta koje čine mikrobiotu je dovelo do spoznaje da su određene kombinacije bakterijskih vrsta povezane s nekim bolestima.

Prva je faza završila 2013.godine. Do tada je uspješno sekvencioniran genom 2200 izoliranih sojeva bakterija, sudjelovalo je 300 pojedinaca između 18 i 40 godina, uzorci su im bili uzeti jednom ili u više navrata s ukupnim brojem od 11000 uzoraka (22). Utvrđeno je da je jako mali broj bakterijskih vrsta prisutan u uzorcima s iste lokacije u svih pojedinaca, ali kada se gleda 95%tna prisutnost u svih ispitanika, najviše je zajedničkih vrsta prisutno u usnoj šupljini, zatim u stolici i nosnicama, a najmanje na koži i u vagini (23).

Trenutno je u tijeku druga, integrativna faza HMP-a nazvana iHMP. Cilj ove druge faze je integrirati podatke o mikrobiomu i genomu čovjeka iz 3 različite studije o promjenama u mikrobiomu i domaćinu u trima različitim stanjima: trudnoća i prijevremeni porođaj, crijevne upalne bolesti i stresori koji utječu na pojedince s predijabetesom, a sve kako bi se uočile interakcije između mikrobioma i domaćina (Slika 1.). Istražuju se promjene u domaćinovoj imunosti, metabolizamu i molekularnoj aktivnosti (22).



Slika 1. HMP se sastoji od dvije faze: HMP1 i HMP2. Prikazani su ciljevi obiju faza projekta. (Preuzeto s: https://www.nature.com/articles/s41586-019-1238-8/figures/1)

1.3. Razvoj mikrobiote i disbioza

U ljudi, kao i u ostalih sisavaca, kolonizacija se počinje događati tijekom intrauterinog života, transplacentarnim prijenosom mikroba iz majčinog organizma, a nakon toga je njen intenzivan razvoj određen vrstom poroda, načinom prehrane novorođenčeta i izlaganjem antibioticima (24). Zbog toga je mikrobiom heterogen i nestabilan prve 2-4 godine života, kada postaje stabilnijim i počinje nalikovati onome u odraslih ljudi (25). Uzimajući u obzir veliku varijabilnost mikrobioma među pojedincima, teško je odrediti što je zdrava mikrobiota.

Mogućnost liječenja ili sprječavanja bolesti modulacijom mikrobioma pojedinca veliki je izazov u mnogim područjima medicine. Zdravi mikrobiom karakterizira njegova sposobnost da se obrani od štetnih događaja i da se potpuno oporavi nakon izloženosti

smetnjama koje bi mogle dovesti do narušavanja zdravlja i stanja neravnoteže (18). Osim bakterija, koje čine najveći udio, sastavnice zdrave ljudske mikrobiote su i neki virusi (primarno bakteriofagi), gljive, članovi arheja (rod Methanobrevibacter) i drugi eukarioti. Njihova funkcija je manje poznata od uloge bakterija zbog toga što su metode detekcije i analize manje razvijene (9). To nije zabrinjavajuće zbog toga što se smatra da oko 99% mikrobioma čine bakterijski geni (26).

Međusobno koristan odnos (simbioza) u kojem čovjek živi sa svojom mikrobiotom može biti narušen kada se dogodi promjena mikrobnog sastava poznata kao disbioza (27) koja može utjecati na razvoj nekih bolesti poput: alergijskih bolesti, šećerne bolesti, malignih bolesti, upalnih bolesti crijeva i adipoznosti. Do takvog učinka može doći zbog brojnih vanjskih i unutarnjih čimbenika, a neki od njih su: promjene u prehrani, primjena antibiotika, starenje te drugi utjecaji iz okoliša (11). Međutim, još uvijek nije razjašnjena uzročno-posljedična veza između disbioze i bolesti. Naime, moguće je da je disbioza uzrok kronične bolesti, ali isto tako i da je njena posljedica (28). Mikrobiota čovjeka ima značajnu metaboličku, imunološku i zaštitnu ulogu (29).

1.4. Mikrobiota gastrointestinalnog sustava

Ljudska crijeva sadržavaju najveći broj komenzalnih mikroorganizama. Njihova je prisutnost potrebna za optimalnu probavu hrane, produkciju vitamina i opskrbu hranjivim tvarima (30) što se ostvaruje preko njihove funkcije u jačanju integriteta stijenke, oblikovanju intestinalnog epitela (31), zaštiti od patogena (32) i u metaboliziranju nekih vrsta hrane. Najvažnije metaboličke funkcije su sudjelovanje u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, bjelančevina i lipida, sinteza kratkolančanih masnih kiselina, sinteza vitamina K i nekih vitamina B skupine te metabolizam ksenobiotika i lijekova (29). Zaštita od patogena se ostvaruje zauzimanjem životnog prostora i kompeticijom za nutrijente, stimulacijom lokalnog imunosnog odgovora i proizvodnjom raznih spojeva s antimikrobnim učinkom (28). Kolonizacija crijeva mikroorganizmima je ključna za razvoj i funkciju intestinalnog imunološkog sustava (30). Na molekularnoj je razini ova crijevna homeostaza posljedica induciranja regijski-ovisne transkripcije gena u sluznici crijeva (33).

Nedavno otkriće da mekonij novorođenčeta nije sterilan dovelo je do napretka u razumijevanju transplacentarne komunikacije između majke i fetusa jer to znači da naseljavanje probavnog sustava mikroorganizmima započinje već intrauterino (34). Nastavak kolonizacije događa se tijekom porođaja te ovisi o načinu porođaja. Naime, crijeva djece

rođene vaginalnim putem koloniziraju se mikroorganizmima s epitela vagine (*Lactobacillus*) (35,36), dok se crijeva djece rođene carskim rezom koloniziraju fakultativnim anaerobima (*Clostridium sp.*). Smatra se da u dobi od 2,5 godine djetetova crijevna mikrobiota nalikuje onoj odrasle osobe (37,38). S godinama se smanjuje raznolikost mikrobiote, posebice nakon 65. godine kada se javljaju upalne promjene koje su povezane s disbiozom te posljedično s pogoršanjem bolesti i slabosti u starih ljudi (11).

Razlike u raznovrsnosti mikrobioma pronađene su za nekoliko bolesti, primjerice manjak raznolikosti mikrobioma u crijevima pretilih osoba i osoba koje boluju od upalnih crijevnih bolesti (39,26). Isto tako je utvrđena povezanost između intestinalne mikrobiote i raznih poremećaja, uključujući i autoimune bolesti (40). U zadnje se vrijeme također uočavaju promjene u mikrobioti tijekom intestinalne karcinogeneze te uloga intestinalne disbioze u razvoju zloćudnih tumora debelog crijeva (41-43).

Jedan od faktora koji utječu na ove poremećaje u crijevima je kronična upala povezana s promijenjenom imunosnom tolerancijom prema crijevnim mikroorganizmima koja može rezultirati oštećenjem barijerne funkcije crijevne sluznice vodeći prema upalnim bolestima crijeva (44), a isto tako i predstavljati rizični faktor za kolitis-povezani karcinom kolona i rektuma (kolorektalni karcinom) (45). Etiološka je uloga mikroba u nekim zloćudnim tumorima u debelom crijevu već određena (46). Slične se interakcije počinju otkrivati i u spolnom i mokraćnom sustavu (47,48).

1.5. Povezanost intestinalne mikrobiote i cirkadijanog ritma

Intestinalna mikrobiota tijekom dana podliježe promjenama sastava i funkcionalnim oscilacijama koje utječu na metaboličku homeostazu. Cirkadijani sat predstavlja unutrašnji sustav osjećanja vremena. On regulira različite fiziološke procese putem stvaranja 24-satnog cirkadijanog ritma ekspresije gena, koji se onda prevode u ritmove metabolizma i ponašanja. Naziv je porijeklom latinski: *circa* (oko, tijekom) i *diem* (dan). Važan je regulator fizioloških funkcija koje uključuju metabolizam, spavanje, tjelesnu temperaturu, krvni tlak, endokrinu, imunološku, kardiovaskularnu i bubrežnu funkciju.

Poremećaji u cirkadijanom ritmu i genima koji ga kontroliraju vodi patološkim stanjima povezanim s oksidativnim stresom, uključujući mentalne bolesti, zloćudne tumore, pretilost, dijabetes mellitus tipa 2, kardiovaskularne bolesti i starenje. Zbog toga je postalo očito da cirkadijani ritam ima važnu ulogu u održavanju zdravlja i da je većina fizioloških

funkcija tijesno povezana s fazama aktivnosti i odmora organizma kako bi se smanjila mogućnost greški u njihovom provođenju (49,50).

Sastoji se od dvije glavne komponente: centralnog sata, koji se nalazi u suprahijazmatskoj jezgri u mozgu, i od perifernih satova koji su prisutni u skoro svakom tkivu i organskom sustavu. Cirkadijani sat sisavaca u suprahijazmatskoj jezgri (SCN) hipotalamusa prilagođava fiziološke procese dnevnim okolišnim varijacijama koordinacijom oscilacija transkriptoma u perifernim tkivima. I centralni i periferni sustav se mogu resetirati okolišnim čimbenicima, koji se nazivaju ger. Zeitgebers (generatori vremenskih impulsa). Dominantni čimbenik je svjetlost, koja se registrira retinom i signalizira direktno SCN. Centralni sat daje informacije perifernim satovima preko neuronskih i hormonskih signala, tjelesne temperature i rasporedom unosa hrane te na taj način usklađuje sve satove s izvanjskim ciklusom noć-dan.

Cirkadijani ritmovi omogućavaju organizmu postizanje stalne homeostaze s okolišem na molekularnoj razini regulacijom ekspresije gena. Na taj se način stvara vršna proteinska ekspresija svaka 24 sata da bi se kontroliralo kada je određeni fiziološki proces najaktivniji tijekom dana. Transkripcija i translacija komponenti središnjeg sata (CLOCK, NPAS2, ARNTL/BMAL1, ARNTL2/BMAL2, PER1, PER2, PER3, CRY1 i CRY2) ima ključnu ulogu u stvaranju ritma u svakoj pojedinoj stanici, dok su odgode putem posttranslacijske modifikacije važne za određivanje trajanja jednog perioda. Srž ovog molekularnog cirkadijanog mehanizma čini transkripcijsko-translacijska povratna sprega. Transkripcijski faktori, CLOCK ili NPAS2 i ARNTL/BMAL 1 ili ARNTL2/BMAL 2, tvore pozitivni dio sprege koji u obliku heterodimera aktiviraju transkripciju gena centralnog sata i satom-kontroliranih gena (uključenih u važne metaboličke procese). Geni središnjega sata PER1,2,3 i CRY1,2 stvaraju transkripcijske represore koji tvore negativni dio sprege (51).

Stanični je metabolizam također pod velikim utjecajem aktivnosti cirkadijanog ritma na način da se prilagođava varijacijama metaboličkih potreba organizma tijekom dana. Zbog toga su ritmičke fluktuacije razine metabolita u određenom tkivu pod utjecajem komponenti molekularnog sata (52). Ti metaboliti služe kao važna povratna informacija u mreži cirkadijanog sata stvarajući tako dvosmjernu povratnu spregu između aktivnosti staničnog metabolizma i cirkadijanog sata (53).

Nedavno je otkriveno da, uz cirkadijane promjene u fiziologiji domaćina, postoje i cirkadijane oscilacije u sastavu i funkciji intestinalne mikrobiote (54,55). Ove su oscilacije pod utjecajem vremena uzimanja hrane i načina prehrane (54). Interakcije između domaćina i

crijevnog mikrobioma tijekom dana mogu utjecati na aktivnost cirkadijanog sata u različitim tkivima (54,56) i od kritične su važnosti za metaboličku homeostazu domaćina jer greška u ritmičkoj kontroli mikrobiote rezultira disbiozom koja promovira pretilost i druge manifestacije metaboličkog sindroma (57).

Oscilacije u proizvodnji metabolita crijevne mikrobiote i rasprostranjenosti pojedinih vrsta bakterija u određenom trenutku u danu induciraju homeostatsko stanje u kojemu je domaćin periodično izložen različitom broju, vrsti i bakterijskoj aktivnosti, kao i različitim metaboličkim produktima u određenom trenutku u danu. Ovo ritmično mikrobno ponašanje utječe na globalne transkripcijske, epigenetičke i metaboličke dnevne oscilacije domaćina. Poremećaj u homeostatskom mikrobijalnom ritmu utječe ne samo na navedene normalne oscilacije već potiče cjelogenomske *de novo* oscilacije u ekspresiji gena u crijevima i u jetri te na taj način utječe na promjene u domaćinovoj fiziologiji i osjetljivosti na bolesti. Na temelju toga je zaključeno da mikrobiota utječe na homeostatske cirkadijane varijacije u jetrenoj detoksikaciji lijekova i hepatotoksičnosti.

Ova uloga crijevne mikrobiote potvrđena je eksperimentima na *germ free* miševima i miševima tretiranih antibioticima u kojih dolazi do masivnog reprogramiranja epigenetičkog i transkripcijskog procesa u crijevima, uključujući velike *de novo* promjene oscilirajućih histonskih oznaka i ritmički izraženih gena. Dnevna ritmičnost je esencijalna komponenta u regulaciji simbioze između domaćina i mikrobiote. Mikrobiom je kritični faktor koji regulira odabir domaćinovih gena koji će biti eksprimirani (58).

NFIL3 je cirkadijani transkripcijski faktor u epitelnim stanicama (kontroliran cirkadijanim satom) (59). Eksprimiran je u raznim imunosnim stanicama i kontrolira imunosne funkcije ovisno o tome u kojoj se vrsti stanice nalazi (60). Stanice tankog crijeva također eksprimiraju NFIL3, a ta je ekspresija značajno smanjena u *germ-free* miševima što znači da NFIL3 regulira fiziološku aktivnost koja je u suradnji s intestinalnom mikrobiotom, tj. treba biti prisutna mikrobiota za maksimalnu ekspresiju NFIL3. Ekspresija NFIL3 je direktno regulirana središnjim cirkadijanim transkripcijskim represorom REV-ERBα. U T-stanicama i u jetrenim stanicama, REV-ERBα se veže za odgovarajuću sekvencu na Nfil3 genskom lokusu i potiskuje njegovu transkripciju čime se regulira ritmična dnevna ekspresija NFIL3 (61). REV-ERBα transkript i protein također osciliraju tijekom dana u intestinalnim epitelnim stanicama te su njihove razine više u *germ-free* nego u konvencionalnim miševima. Utvrđeno je da REV-ERBα upravlja cirkadijanom ritmičnošću ekspresije NFIL3 i da mikrobiota inducira NFIL3 ekspresiju represijom REV-ERBα ekspresije preko dendritičnih

stanica. Bakterija se veže za Toll-like receptor na dendritičkim stanicama što potiče lučenje IL23 koji djeluje na prirođene limfoidne stanice ILC3 da luče IL22; IL22 u epitelnim stanicama dovodi do fosforilacije STAT3 koji se veže na REV-ERBa promotor i inhibira njegovu transkripciju.

2004.godine je otkriveno da je NFIL3 također uključen u regulaciju sastava tijela preko unosa lipida. Ove interakcije mogu pomoći u objašnjavanju zašto su poremećaji cirkadijanog ritma u ljudi koji se događaju zbog rada u smjenama na poslu ili čestih interkontinentalnih putovanja često povezani s metaboličkim bolestima, uključujući pretilost, dijabetes i kardiovaskularne bolesti. U istraživanjima na genetički modificiranim miševima kojima je inaktiviran gen za NFIL3 u epitelnim stanicama (*knockout*), pronađeno je da postoje razlike u 17 transkripata koji kodiraju proteine koji pomažu uključivanje lipida u mišji metabolizam. Ako nema tih proteina, nema pretilosti ni inzulinske rezistencije u miševa. NFIL3 kontrolira ekspresiju cirkadijanog lipidnog metaboličkog programa i regulira apsorpciju i izlučivanje lipida u intestinalnim epitelnim stanicama (62).

Intestinalna je mikrobiota identificirana kao okolišni faktor koji značajno utječe na pohranu energije i akumulaciju masnog tkiva u sisavaca. Dokaz za to je što je u germ-free miševa prisutna manja količina masnog tkiva u odnosu prema standardno uzgojenim miševima (63). Ovo se događa zbog toga što mikrobiota poboljšava apsorpciju energije iz domaćinove prehrane (64) i promovira pohranjivanje energije u masnom tkivu. Objašnjenje na molekularnoj razini je da flagelin i lipopolisaharidi koje produciraju Gram-negativne pokretne bakterije podešavaju amplitudu oscilacija cirkadijanog transkripcijskoga faktora NFIL3 preko ILC3 (koji održava intestinalnu homeostazu), STAT3 i epitelnog staničnog sata.

Ova saznanja pružaju uvid u mehanizam kojim intestinalna mikrobiota regulira sastav tkiva i predstavljaju NFIL3 kao ključnu molekularnu poveznicu između mikrobiote, cirkadijanog ritma i domaćinova metabolizma. ILC3-STAT3 signalizacijski put je najvažnija poveznica između mikrobiote i cirkadijanog sata. Ta bi saznanja mogla dovesti do novih strategije liječenja metaboličkog sindroma ciljanjem na NFIL3, STAT3, mikrobiotu ili cirkadijani sat (62).

1.6. Mikrobiota mokraćnog sustava

Urin je donedavno smatran sterilnim jer se iz uzoraka urina zdravih ljudi bakterije nisu mogle kultivirati u mikrobiološkim laboratorijima standardnim metodama. Međutim, napretkom mikrobiološke tehnologije nedavna su istraživanja ovu tvrdnju dovela u pitanje

detekcijom mikroorganizama u uzorku urina korištenjem molekularne metode-16S rRNA sekvencioniranja te modificiranim EQUC protokolom za kultivaciju urina (stavljanje većeg volumena urina, prolongirana inkubacija pod različitim atmosferskim uvjetima) (65-67). Sekvencioniranje gena za bakterijsku 16S rDNA naročito je unaprijedilo naše razumijevanje sastava bakterijskih populacija u mokraćnom i spolnom sustavu. Pronađene su razlike u sastavu urinarne mikrobiote u ovisnosti o godinama života (68) te razlike u mikrobiomu između muškaraca i žena. Naime, ženski mokraćni mikrobiom (urobiom) se većinom sastoji od rodova *Lactobacillus* i *Gardnerella*, a muški od *Corynebacterium*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*. Moguće je da ova razlika pridonosi većoj pojavnosti genitourinarnih karcinoma u muškaraca (69,70).

Za određene komenzalne bakterije u urinarnom mikrobiomu je moguće da imaju ulogu u kontroli rasta patogenih bakterija, slično kao što vaginalna *Lactobacillus* flora ima ulogu u kontroli vaginalnih infekcija (71).

S druge strane, poznato je da su određene genitourinarne infekcije rizični faktor za razvoj određenih zloćudnih tumora, kao što je parazitarna infestacija (schistosomijaza) uzrok karcinoma mjehura pločastih stanica. Zanimljivo je da postoje dokazi da članovi mokraćnog mikrobioma mogu utjecati na schistosomijazom izazvani karcinom. One vrste bakterija koje mogu posredovati stvaranje N-nitrozamina pridonose razvoju karcinoma izazvanog schistosomijazom (72).

Nedavna otkrića mikrobnih populacija koje nastanjuju mokraćni sustav pokazala su da urinarna mikrobiota ima određenu ulogu u razvoju karcinoma mokraćnog sustava koji nije vezan uz infekciju sa *Schistosoma haematobium*. Kao što je dokazano da crijevni mikrobiom može utjecati na razvoj karcinoma i odgovor na lijekove (73,74), može se pretpostaviti slična povezanost u kontekstu urinarnog mikrobioma i karcinoma mokraćnog mjehura. Međutim, nejasna je uzročno-posljedična povezanost: uzrokuje li mikrobiom progresiju karcinoma ili karcinom ima utjecaj na sastav, raznolikost i količinu mikroorganizama. Jedna je hipoteza da mokraćni mikrobiom može promijeniti izvanstanični matriks što može poticati ili sprječavati urotelnu karcinogenezu (75). Pokušaj rasvjetljavanja ove interakcije je studija u kojoj je pokazano da je preživljenje bez progresije bolesti i ukupno preživljenje kraće u pacijenata s nekoliko vrsta raka koji su primali antibiotsko liječenje (beta laktam inhibitori, fluorokinoloni ili makrolidi) 2 mjeseca prije i jedan mjesec nakon prve administracije anti-PD-1/PD-L1 imunoterapije (76). Ovo istraživanje ukazuje na pozitivan učinak mikrobiote u odgovoru na anti-PD-1 liječenje. Taj učinak može biti posredovan interakcijom s mikrobiotom probavnog

sustava, urinarnog sustava ili mikroorganizmima s nekog drugog mjesta (u samom tumoru). Korištenje urinarnog mikrobioma da bi se predvidio rizik za razvoj tumora i odgovor na terapiju je vrlo zanimljiva mogućnost (77).

Ako su mikroorganizmi odgovorni za nastanak ili progresiju tumora ili ako utječu na protutumorsku terapiju, onda treba istražiti kako modulirati mikroorganizme za potencijalnu korist u urinarnom traktu. Veliko zanimanje znanstvenika koji se bave mikrobiomom danas izaziva utjecaj intestinalnog i urinarnog mikrobioma na modifikaciju lijekova koji, posljedično tome, utječe na ishode liječenja tumora navedenih područja. Na primjer, direktna intravezikalna instilacija BCG-a se koristi kao terapija za karcinome mokraćnog mjehura kako bi se spriječio recidiv tumora. Potvrđeno je da se jedan dio djelovanja BCG-a osniva na izazivanju imunološkog odgovora vezanjem na fibronektin, što izaziva tumor-specifičnu imunost (78). Međutim, u današnje vrijeme, spoznajom da u mjehuru postoje komenzalni mikroorganizmi, nameće se mogućnost da je djelovanje BCG posredovano interakcijom s tim komenzalima (77). Jedna od potvrda ovoj ideju pronalazi se u istraživanju u kojem je potvrđeno da su urinarno-specifični laktobacili (*Lactobacillus iners*) potentni vezači fibronektina (79). Ovo saznanje potencijalno može imati veliko značenje zbog moguće konkurencije s BCG-om za vezna mjesta na fibronektinu. Možda će u budućnosti biti moguće manipulacijom mikrobiote urinarnog i intestinalnog trakta poboljšati pacijentove izglede za pozitivan ishod (77).

1.7. Germ-free miševi (GF)

Kako bi se omogućilo proučavanje mikrobiote, relativno novo-upoznatog faktora ljudskog zdravlja, počeli su se upotrebljavati životinjski modeli u kojima je moguće manipulirati mikrobiomom i na taj način razgraničiti uzročne, zaštitne i pomoćne čimbenike u razvoju određenih bolesti (80). Ti životinjski modeli su GF životinje u kojima se kombinacijom kultivacije, mikroskopije, serologije, morfologije i sekvencijskim tehnikama ne mogu detektirati mikroorganizmi (81,82).

GF miševi se uzgajaju u izolatorima koji u potpunosti sprječavaju izlaganje miševa mikroorganizmima s namjerom da se njihov mikrobiološki status održi negativnim na sve detektabilne bakterije, viruse i eukariotske mikroorganizme. Koncept ovih životinja je prvi osmislio Pasteur 1885.godine, a GF glodavci su prvi put uspješno uzgojeni 1940ih godina (83).

Voda, hrana i sva oprema moraju biti sterilizirani (najčešće autoklavirani) prije nego li će doći u kontakt s miševima. Zrak koji ulazi u izolator je također steriliziran.

Stvaranje nove vrste GF miševa zahtijeva da se od nesterilne životinje uzme maternica zajedno s fetusom nakon čega se stavi u staklenu čašu koja sadrži dezinficijens. Nakon toga se prenosi u izolator gdje se maternica otvara, izvadi se mladunčad, očisti te ih se te stimulira na disanje. Tada se mladunčad stavlja zajedno s GF zamjenskom majkom. Ne preporučuje se koristiti prvu generaciju GF miševa u istraživanjima zbog toga što su dobiveni od nesterilne majke i zbog toga postoji mogućnost da su im transplacentarno bili preneseni virusi, bakterije i bakterijski metaboliti. GF status se treba redovito kontrolirati kultivacijom uzoraka fecesa na aerobne i anaerobne bakterije i gljive te PCR testiranjem na prisutnost 16S RNA za bakterije koje se ne mogu kultivirati. GF životinje trebaju dodatke prehrani kao što su vitamin K i B vitamini da bi bili zdravi i pokretni (84).

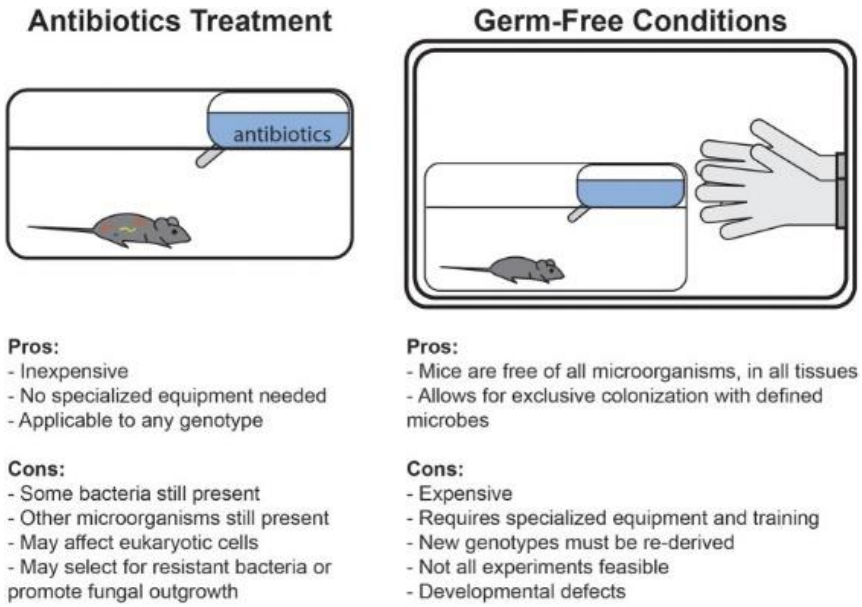
Uz pomoć takvih životinja su otkrivene uloge mikrobioma u metabolizmu, imunološkoj funkciji i rezistenciji na patogene. Oni su trenutno najbolji alat za otkrivanje uzročne veze između mikrobioma i bolesti. Budući da su potpuno lišeni mikroorganizama, oni nude mogućnosti proučavanja kako njih samih u "čistom stanju" tako i nakon eksperimentalnog izlaganja poznatim mikrobima (gnotobiotične životinje) kako bi se mogla proučiti interakcija između domaćina i mikroba (85).

GF životinje kao modeli za proučavanje interakcija mikroorganizama i domaćina korišteni su u raznim područjima medicine kao što su: neurogastroenterologija (86-89), kardiologija (90), reproduktivna biologija (91,92) metabolizam lipida (93) i koštana pregradnja (94). Primjene *germ-free* miševa uključuju:

- identifikaciju uzroka bolesti njihovim uspoređivanjem s konvencionalnim laboratorijskim miševima;
- utvrđivanje na koji način specifični mikrobiom štiti ili pridonosi bolesti;
- analiza kako specifični mikrobi reguliraju procese u domaćinu;
- otkrivanje lijekova koji ciljano djeluju na mikrobiom;
- razumijevanje na koji je način odgovor na lijekove moduliran mikrobiomom (85).

U otkrivanju utjecaja mikrobiote na fiziologiju i razvoj bolesti u miševa koriste se, osim *germ-free* modela, i miševi koji su tretirani antibioticima. Kao što se vidi na Slici 2. prednosti korištenja ovih miševa u usporedbi s germ-free miševima su manja cijena, nisu potrebne specijalizirane ustanove te je potrebno manje posla i specijaliziranog znanja za brigu o njima.

Nedostatci korištenja GF miševa su i ograničen broj genotipova s kojim istraživači mogu raditi jer je kompliciranа proizvodnja miševa s novim genotipovima. Nadalje, potreba da miševi stalno budu u svojim izolatorima može biti nepraktična za neke vrste istraživanja kao što su bihevioralne studije.



Slika 2. Prednosti i nedostatci antibiotski tretiranih i germ-free miševa za njihovo korištenje u istraživanjima. (Preuzeto s: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6220354/)

Kako bi se izbjegle neke od ovih poteškoća, mogu se koristiti miševi tretirani antibioticima širokog spektra. Na taj se način u normalno koloniziranih miševa efikasno smanjuje populacija intestinalne mikrobiote. Ova metoda može biti primijenjena na miševe u bilo kojem stanju i s bilo kojim genotipom. Antibiotski tretirani miševi, zbog toga što su do odrasle dobi imali normalan razvoj i imunološki sustav (jer su bile kolonizirane bakterijama), koriste se u istraživanjima uloge bakterija u održavanju funkcionalnosti stanica i signalnim putevima nakon što se one eliminiraju iz organizma u kojem su prethodno bile normalni simbionti. Mogu biti korišteni različiti antibiotski tretmani ovisno o tome koje se bakterije žele eliminirati. S druge strane, mogu se koristiti pojedini antibiotici kako bi se promijenio sastav crijevne mikrobiote da bi se identificiralo koje su bakterije relevantne za određene fenotipove (95-96). Najčešće im se dostavljaju otopljeni u vodi za piće. Za potvrdu uspješnosti tretmana koriste se metode bazirane na kultivaciji uzoraka fecesa na različitim medijima za kultivabilne mikrobe te kvantitativni PCR gena koji kodira 16S rRNA za nekultivabilne mikrobe.

Međutim, iako većina studija fenotipske razlike koje se pronađu ovim načinom istraživanja pripisuju promjenama u crijevnoj mikrobioti, dokazano je da antibiotskim liječenjem dolazi i do smanjenja količine mikroba u drugim organskim sustavima kao što je dišni sustav (97,98) i vagina (99). Daljnji nedostaci su to što antibiotski tretman može potaknuti prerastanje komenzalnih gljivica u crijevima ili potaknuti nastanak rezistentnih vrsta bakterija te njihov selektivni rast i prerastanje u crijevima (100). Početni bakterijski sastav, vrste antibiotika, trajanje tretmana, antibiotska rezistencija mogu biti zbunjujući faktori pri interpretaciji rezultata.

Zaključno, iako antibiotski tretirani miševi predstavljaju jeftiniju i pristupačniju metodu nego korištenje germ-free miševa, rezultate dobivene njihovim istraživanjem treba uzeti s rezervom zbog mogućeg popratnog neželjenog djelovanja lijeka i nepotpune deplecije mikroba. Dodatan je problem činjenica da različite skupine istraživača koriste različite tretmane što dovodi do nemogućnosti usporedbe njihovih rezultata.

Dok se ne provode standardizacija njihovog uzgoja i tretmana, za analize utjecaja mikrobioma, germ free miševi ostaju zlatni standard (80).

1.8. Specific-pathogen free miševi (SPF)

GF i gnotobiotični miševi se uspoređuju s miševima koji su negativni na patogene koji uzrokuju kliničke ili subkliničke infekcije koje mogu interferirati s rezultatima istraživanja (101), ali posjeduju uobičajenu, komenzalnu mikrobiotu.

To su miševi kod kojih se rutinskim metodama ne mogu detektirati određeni patogeni jer su isključeni iz njihovih kolonija. Najčešće se radi o patogenima koji mogu utjecati na zdravlje miša i rezultate istraživanja, ali isto tako se može raditi o oportunističkim ili komenzalnim mikroorganizmima. Svi miševi u određenom zajedničkom staništu se smatraju slobodnim od određenog patogena ako im je svima test na taj patogen negativan. Ako je samo jedan miš pozitivan na taj određeni patogen, ostali se smatraju izloženim tom patogenu i moraju se registrirati kao mogući nosioci te se moraju dalje testirati kako bi ponovo dobili SPF status za taj mikroorganizam. Jedan miš može imati više SPF statusa, ovisno o tome za koliko je patogena taj SPF soj rađen (102). Izbor tih patogena ovisi o svakoj instituciji. SPF životinje su normalno kolonizirane komenzalima (84).

1.9. Razlike u crijevnoj strukturi i funkciji između GF i SPF miševa

Opažene promjene u crijevnom mikrobiomu u stanjima kroničnih gastrointestinalnih poremećaja dovele su do povećanog zanimanja određivanja uloge crijevnih bakterija u

održavanju funkcije intestinalne barijere. GF miševi predstavljaju mogućnost za proučavanje učinka crijevnih mikroba na domaćinovu gastrointestinalnu fiziologiju (103).

Otkrivanjem učinka komenzalne mikrobiote na biološke procese u crijevu dobiva se važan uvid u funkciju ovog organa u homeostatskim i patološkim uvjetima. Profili ekspresije gena u crijevnom tkivu dobivenom iz konvencionalnih i GF miševa otkrili su jak učinak crijevne mikrobiote na ekspresiju gena (104-106), posebice u masnom tkivu i metabolizmu lipida (povećana ekspresija angiopoetin-sličan gen 4 koji kodira sekretorni regulator metabolizma lipida u GF statusu) (107). Istraživanja su pokazala da potpuni nedostatak bakterija u tankom crijevu *germ-free* miševa ima najveći učinak na imunološki sustav sluznice crijeva. Zanimljivo je da kolonizacija GF životinja mikroorganizmima izaziva dinamične promjene genske ekspresije i prije postizanja homeostaze (108).

GF životinje pokazuju važne razvojne i fiziološke razlike u usporedbi sa SPF životinjama. Primjerice, povećan im je cekum za 4-8 nabora (zbog nakupljanja sluzi i nerazgrađenih vlakana), tanko crijevo im je manje razvijeno, s manjom apsorptivnom površinom, sporijom peristaltikom, nepravilnim resicama i smanjenim obnavljanjem epitelnih stanica. Sve ovo ukazuje na činjenicu da je sposobnost iskorištavanja nutrijenata narušena. S druge strane, GF štakori žive duže i razvijaju manje spontanih zloćudnih tumora nego SPF štakori (109).

U ovim istraživanjima su otkrivene značajne posljedice nedostatka crijevne mikrobiote na druge organske sustave. Naime, u slučaju da se kolonizacija probavnog sustava dogodi u kasnijoj dobi, imunološki je odgovor na različite stimulanse smanjen i nikada se ne uspije razviti do razine u kojoj se nalazi u životinjama koje se uzgajaju u standardnim uvjetima (104). Oralna tolerancija na različite bakterije i antigene u hrani se u miševa razvija u neonatalnom periodu i ne može biti potpuno razvijena u odraslih miševa izloženih bakterijskoj kolonizaciji koji su u mladoj dobi bili uzgajani u *germ-free* uvjetima (110). Rezultat nedostatka imunosne tolerancije u GF životinja je češća pojava alergija i upalnih ili metaboličkih poremećaja kao što je dijabetes mellitus (111).

2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka provedenog istraživanja je da prisutnost mikrobiote mijenja izražaj gena u mokraćnom mjehuru, organu koji je, kroz mokraćnu cijev, u direktnom kontaktu s okolišem.

Provedeno istraživanje testiralo je postavljenu hipotezu mjereći ekspresiju gena: Lama 1, Tnc, Cldn1, Col2a1, Egfr, Per1, Per2, Per3, Reverbα, Spon2, Tef, Arntl, Mup7 i Nfil3.

3. ANIMALNI MODELI I METODE

3.1. Animalni modeli i uzorci

Ispitivanje je provedeno na uzorku od 12 SPF i 12 GF miševa soja C57BL/6 (tzv. black 6), starih 6 tjedana. Ukupno je bilo 12 mužjaka i 12 ženki od čega je polovica bila SPF, a polovica GF miševi. Miševi su uzgojeni u institutu Gulbenkian de Ciência (IGC) u Oieirasu, Portugal gdje su i žrtvovani te su prikupljeni uzorci mokraćnih mjehura.

SPF (*specific pathogen free*) miševi su uobičajeni laboratorijski miševi te imaju normalan mikrobiom. Za postizanje SPF statusa miševi moraju biti testirani na prisutnost specifičnih patogena koji mogu utjecati na njihov zdravstveni status. Lista mikroorganizama koji su isključeni iz kolonija SPF miševa dostupna je na stranici Charles River Laboratorija (Charles River Laboratories, Inc, Wilmington, Massachusetts, SAD) (112).

GF (*germ free*) miševi žive u potpunom odsustvu mikroorganizama te stoga nemaju niti svoj tjelesni mikrobiom. Žive u sterilnim uvjetima sve do njihovog žrtvovanja, daje im se isključivo sterilna hrana i piće te u njihove inkubatore dopire samo sterilan zrak. Uzorci stelje i fecesa se redovito kontroliraju na prisutnost bakterija kako bi se otkrila mogućnost kontaminacije. Odmah po žrtvovanju, miševima je izvađen mokraćni mjehur te je prepolovljen kirurškim nožem. Polovica mjehura je uronjena u fiksativ, neutralni puferirani formalin te je uklopljena u parafin. Druga polovica je odmah smrznuta ("*snap frozen*") u tekućem dušiku te je iz nje izolirana RNA korištena za testiranje izražaja gena.

Sav rad na životinjama je proveden prema europskim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja. Rad na životinjama je obavljen u Institutu Gulbenkian u Portugalu te su za njega dobivene sve potrebne dozvole. Način postupanja s miševima je poštovao 3R pravila FELASA-e (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) (113). Rad na prikupljenim uzorcima je obavljen u Laboratoriju za istraživanje raka pri Katedri za imunologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Splitu u sklopu HRZZ projekta "Uloga upale u razvoju zloćudnog tumora mokraćnog mjehura".

3.2. Postupak izolacije RNA iz tkiva

Uzorci mokraćnih mjehura su čuvani u tekućem dušiku do trenutka izolacije RNA. Odmah po vađenju iz tekućeg dušika tkiva su smrvljena uz pomoć naprave za homogenizaciju tkiva te su takvi uzorci prebačeni u 500 μL Qiazol Lysis reagensa (Qiagen, Hilden, Njemačka). Svi postupci su provedeni u tubicama koje su deklarirano čiste od DNA, RNA te enzima DNAza i RNAza kao mjera opreza od kontaminacije i degradacije uzorka. Uzorci su vorteksirani i ostavljeni na sobnoj temperaturi 5 minuta. Uzorcima je dodano 0,2 mL

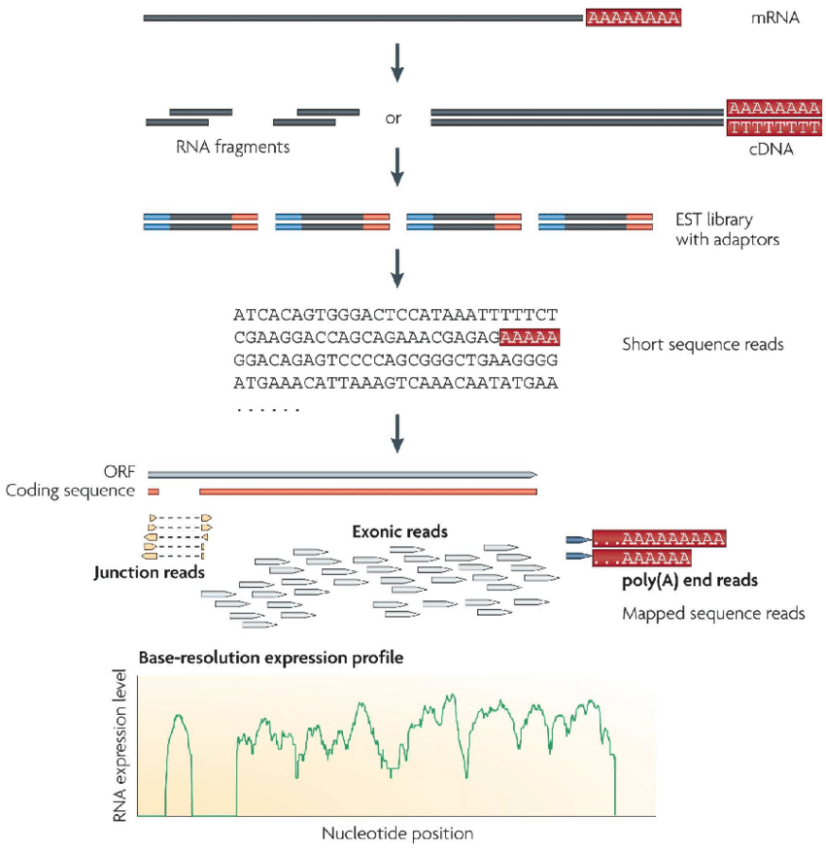
kloroforma i vorteksirani su 15 sekundi te ostavljeni na sobnoj temperaturi 3 minute. Potom su uzorci centrifugirani na 12000 petnaest minuta na temperaturi od 4°C. Rezultat centrifugiranja je stvaranje tri faze iz smjese: organski sloj s proteinima je na dnu tubice, DNA je u prstenu koji se nalazi između dvije faze, a RNA je u gornjem, vodenom sloju. Gornja faza u kojoj se nalazi RNA pipetiranjem je prebačena u novu tubicu te joj je dodano 250 μL izopropanola. Potom je uzorak vorteksiran i inkubiran na sobnoj temperaturi 10 minuta. Ponovljeno je centrifugiranje na 12000 deset minuta na temperaturi od 4°C nakon čega je sva RNA precipitirala u bijeli talog na dnu tubice. Supernatant je zatim aspiriran te je na talog dodano 500 μL 75% etanola. U sljedećem koraku uzorci su centrifugirani na 7500 petnaest minuta na temperaturi od 4°C. Alkoholni supernatant je uklonjen te je RNA talog ostavljen par minuta da se osuši. U posljednjem koraku RNA je otopljena u 20 μL vode nekontaminirane s DNA, RNA te RNA-razgrađujućim enzimima. Koncentracija RNA je izmjerena spektrofotometrom (NanoDrop spectrophotometer, NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, USA). Uzorci su zatim pohranjeni na -80°C do postupka sinteze cDNA.

3.3. RNAseq

RNA sekvencioniranje jedna je od metoda sekvencioniranja sljedeće generacije koja omogućuje određivanje i kvantificiranje svih RNA eksprimiranih u biološkom uzorku. Koristi se da bi se analizirao cjelokupni sadržaj transkribiranih sekvenci u tkivu koji se kontinuirano mijenja (114), primjerice u stanici prije i nakon infekcije određenim patogenom.

Ova metoda također olakšava mogućnost uočavanja transkripata alternativnog izrezivanja gena, posttranskripcijskih modifikacija, fuziranih gena (primjerice BCR-ABL), mutacija, jednonukleotidnih polimorfizama i promjena u genskoj ekspresiji tijekom vremena ili promjena u genskoj ekspresiji u različitim grupama ili tretmanima (115). Uz to što prepoznaje mRNA transkripte, ova metoda također može razlučiti različite vrste RNA pa tako mjeriti miRNA, tRNA, ukupnu RNA ili ribosomsko profiliranje (116). Može se koristiti i za određivanje granica između egzona i introna. Najnovije mogućnosti RNAseq omogućuju sekvencioniranje jedne stanice i *in situ* sekvencioniranje fiksiranog tkiva (117). Prije RNAseq, genska ekspresija se proučavala hibridizacijom na mikročipovima. Problemi te metode su bili artefakti zbog križne hibridizacije, loša kvantifikacija slabo i jako izraženih gena, potreba za poznavanjem željene sekvence prije početka eksperimenta i otkrivanje samo onih transkribiranih sekvenci koje hibridiziraju s probom na mikročipu (118).

RNA-seq se izvodi tako da se stanične mRNA izoliraju, pretvaraju u cDNA reverznom transkripcijom i podvrgavaju sekvencioniranju sljedeće generacije (Slika 3.).

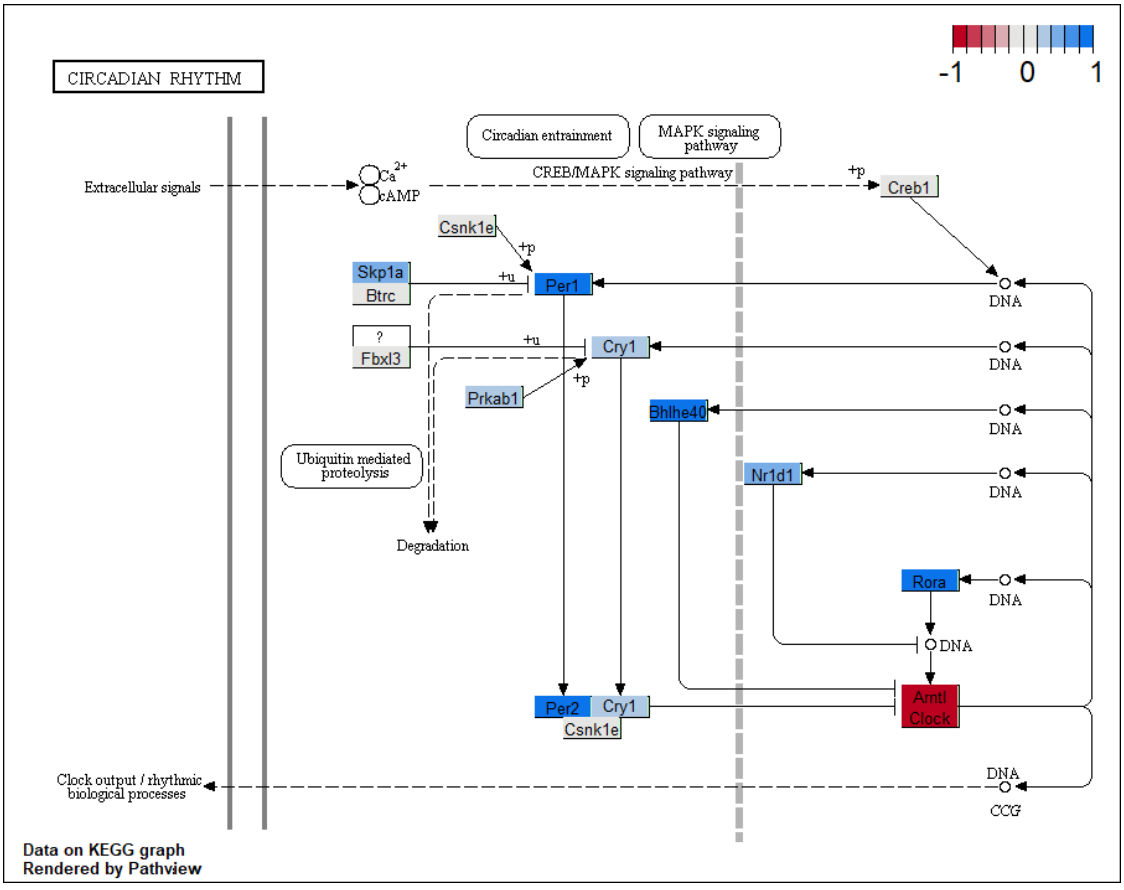


Slika 3. Prvo se duge mRNA sekvence pretvaraju u knjižnicu cDNA fragmenata putem RNA ili DNA fragmentacije. Sekvencirajući adaptori (plavo obojeni) se dodaju svakom cDNA fragmentu i kratka se sekvenca očita iz svake cDNA koristeći sekvencijske tehnologije. Rezultirajuće sekvence se uspoređuju s referentnim genomom ili transkriptomom te se klasificiraju u 3 skupine: egzonska sekvenca, sekvenca iz spojeva i sekvence poli(A) krajeva. Ova se tri tipa koriste kako bi se stvorio ekspresijski profil za svaki gen na osnovi pozicije nukleotida i razine RNA ekspresije. Prikazan je primjer za kvaščev ORF (*open reading frame*-otvoreni okvir čitanja) s jednim intronom. (Preuzeto s: https://www.nature.com/articles/nrg2484).

Pretvaranje u cDNA je potrebno zbog toga što je DNA stabilnija molekula i omogućava amplifikaciju koja koristi DNA polimerazu. Kvantifikacija se određuje frekvencijom kojom se pojedinačne sekvence detektiraju u RNAseq jer je ona proporcionalna količini RNA u stanici. Jedna od zanimljivosti otkrivenih analizom RNAseq je ta da se transkribira mnogo više RNA od očekivane koju kodiraju protein-kodirajući geni jedne ljudske stanice (119). Jedno od važnih otkrića dobivenih ovom metodom je otkriće

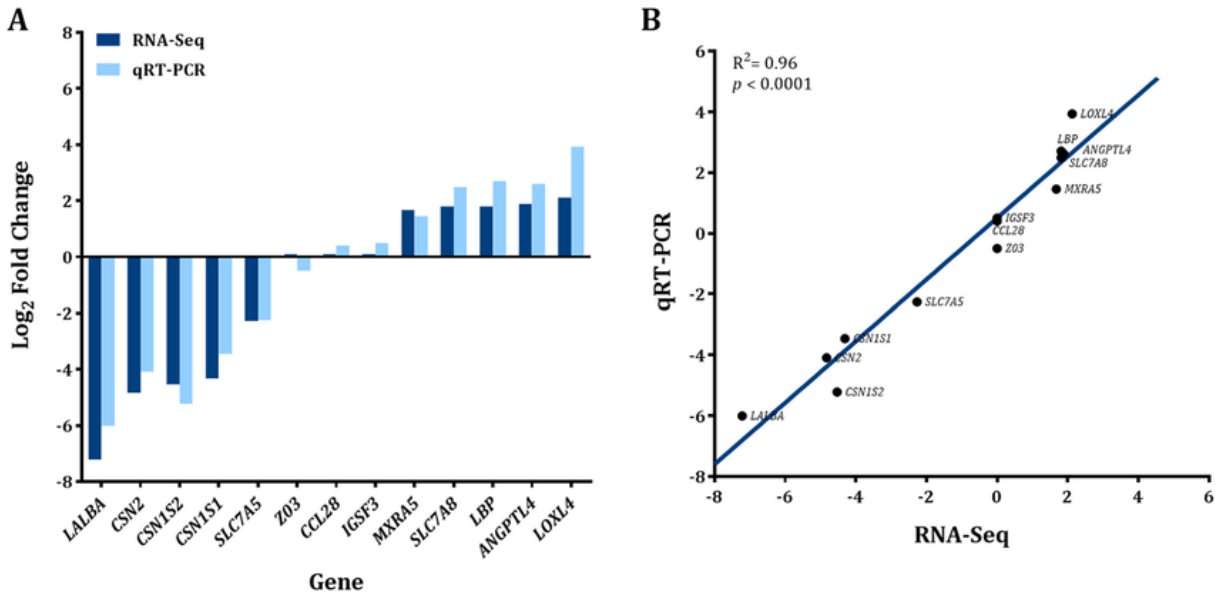
malobrojnih specijaliziranih stanica u plućnima koje se zove plućni ionociti koji eksprimiraju CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) čija je mutacija odgovorna za nastanak cistične fibroze (120,121). Ova metoda ima primjenu u embriologiji, neurologiji, onkologiji, autoimunim bolestima i infektivnim bolestima. Najčešće se koristi za usporedbu genske ekspresije u dvama stanjima, primjerice liječenih i neliječenih da bi se vidjelo koji su geni više, a koji manje eksprimirani u pojedinom stanju.

Rezultati RNAseq analize su bili osnova za planiranje ovog istraživanja. Naime, na mokraćnim mjehurima 6 GF i 6 SPF miševa provedeno je RNA sekvencioniranje kako bi se utvrdilo postoje li razlike u genskoj ekspresiji među dvjema skupinama (istraživanje bez hipoteze). Utvrđeno je da postoje određene razlike kao što prikazuje Slika 5.



Slika 5. Signalni put cirkadijanog ritma. Intenzitetom i bojom prikazane su razlike u ekspresiji gena signalnog puta GF u usporedbi sa SPF miševima. Crvena boja prikazuje smanjenu ekspresiju, a plava boja povećanu ekspresiju pojedinog gena. Primjerice, Per1 i Per2 pokazuju veću ekspresiju, a Arntl i Clock manju ekspresiju u GF miševa u odnosu na SPF.

Sljedeći je korak bio validirati ovaj pronalazak na nekoliko najznačajnijih otkrića metodom PCR reakcije u stvarnom vremenu (*real time* PCR ili qPCR) što je uobičajen postupak pri analizi ekspresije gena kao što je prikazano na primjeru na Slici 6.



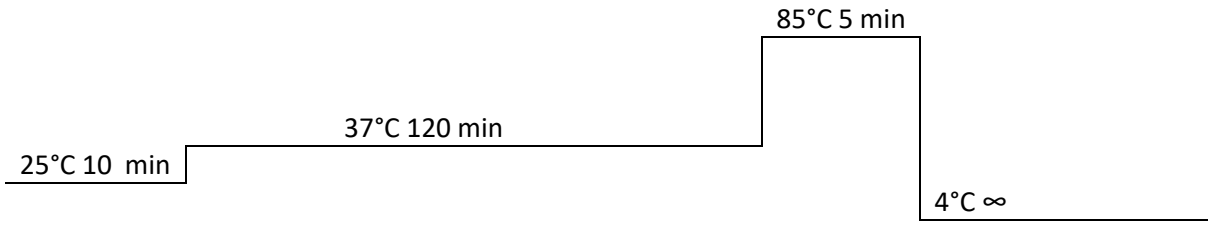
Slika 6. Potvrda rezultata dobivenih RNA sekvencioniranjem metodom qPCR-a. (A) Usporedba RNAseq (tamno plavi stupci) i qRT-PCR (svijetlo plavi stupci) korištenjem log2 fold change za 5 različito eksprimiranih gena od kojih je za njih 5 smanjena ekspresija (LABLA, CSN2, CSN1S2, CSN1S1, SLC7A5; n=12), za 5 povećana ekspresija (MXRA5, SLC7A8, LBP, ANGPTL4, LOXL4; n=12), a za 3 slična ekspresija (CCL28, IGSF3, ZO3; n=12) tri dana nakon početka suhog perioda u krava koje proizvode mlijeko u odnosu na tri dana prije suhog perioda. (B) Korelacija rezultata između genske ekspresije korištenjem RNAseq i qRT-PCR (R2=0,96, p<0,0001). (Preuzeto s: https://www.researchgate.net/figure/Validation-of-RNA-Sequencing-results-by-quantitative-RT-PCR-A-Log-2-fold-change_fig3_326558739)

3.4. Sinteza cDNA

Reverzna transkripcija-PCR je metoda za reverznu transkripciju RNA u komplementarnu DNA ili cDNA. U reakciji se koriste reverzna DNA polimeraza, nukleotidi i mješavina početnica sa sekvencama od šest nasumično poredanih baza što se vidi u Tablici 1, a na Slici 7. je prikazan temperaturni program u PCR uređaju za vrijeme reverzne transkripcije.

Tablica 1. Popis komponenti i njihovih količina za reverznu transkripciju lančanom reakcijom polimeraze.

Komponenta	**V(reakcija) / µL**
10X RT buffer	2,0
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe^{TM} Reverse Transctiptase	1,0
RNAse Inhibitor	1,0
Nuclease free H_2O	3,2
Ukupno	10



Slika 7. Shematski prikaz temperaturnog programa u PCR uređaju za vrijeme reverzne trasnkripcije.

1 µg dobivene RNA u 20 µL smjese preveden je u komplementarnu DNA (cDNA) koristeći *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

3.5. Dizajniranje početnica (primera)

Postupak dizajniranja početnica važan je za uspješno provođenje RT-PCR reakcije. U ovom su se istraživanju poštovala sljedeća pravila pri dizajniranju početnica:

- duljina amplikona, odnosno regije RNA koja će se umnažati, ne prelazi 200 parova baza zato što veći amplikoni imaju dulje vrijeme umnažanja;
- duljina primera je 18-24 nukleotida;
- primeri su specifični za željenu sekvencu;
- u njihovim sljedovima ne smiju biti prisutni ponavljajući uzorci zbog toga što oni mogu neprikladno hibridizirati;
- primeri trebaju imati kompatibilne temperature taljenja (max razlika iznosi 5°C) i sadržavati 50% GC;
- za potvrdu specifičnosti primera se koristi BLAST pretraživanje javnih baza podataka kako bi se osiguralo da primeri prepoznaju isključivo željenu sekvencu.

Za potrebe ovog rada su se geni odabrali na temelju rezultata RNAseq. Dizajniranje primera je napravljeno u NCBI bazi podataka gdje je prvo pronađena sekvenca mRNA za željeni gen za miša (*mus musculus)*. Zatim su na istoj stranici napravljeni primeri uz pomoć alata za dizajniranje početnica Primer-BLAST. Podešena je optimalna duljina amplikona na 100 pb te je izabrana opcija da se primeri moraju lijepiti na egzon-egzon spojeve. Ovo se radi zato što mRNA, za razliku od genomske DNA, sadrži samo egzone što znači da će primeri specifično umnožavati mRNA, ali ne i genomsku DNA te je izbačena mogućnost iskrivljavanja rezultata zbog kontaminacije genomskom DNA. Početnice su dizajnirane tako da umnažaju sve transkripcijske varijante gena te da vezno mjesto primera ne sadrži poznate SNP (*single nucleotide polymorphism*) u sekvenci.

Kako bi se provjerila efikasnost primera, korištena su serijska razrjeđenja poznate cDNA koncentracije.

U Tablici 2. su prikazani sljedovi nukleotida *forward* (F) i *reverse* (R) primera za gene korištene u ovom istraživanju.

Tablica 2. Popis primera korištenih u ovom istraživanju. Prikazani su sljedovi nukleotida forward i reverse primera te njihova duljina. Oznaka m prije naziva oligonukleotidnog primera označava da su ovo primeri napravljeni za istraživanje mišjih gena (*mouse*).

DNA Oligo Name	DNA Sequence (5' -> 3')	Length
mSpon2 F	TTGCCAGGTGATGGAAAACG	20
mSpon2 R	CGGGCTGTACAAACCGATTC	20
mAdamts4 F	TGTCATGGCTCCTGTCATGG	20
mAdamts4 R	AGGCAGTGCCCATAACCATT	20
mMup7 F	CACAAAGCCTAACAGAGGTAGAG	23
mMup7 R	TACTCTCTGGGTTCAGCGGG	20
mPer1 F	CTCCTGCTCCAGTGACTTTCC	21
mPer1 R	GGCTTGGCCCGAGATTCAA	19
mArntl F	GTAGATCAGAGGGCGACAGC	20
mArntl R	CCTGTGACATTCTGCGAGGT	20
mTef F	TGTCCAGCACAGAATCGTCC	20
mTef R	GCAGGGTCAGGGTTGAAGTT	20
mPer2 F	CCATCCACAAGAAGATCCTAC	21
mPer2 R	GCTCCACGGGTTGATGAAGC	20
mRev-erba F	ACATGTATCCCCATGGACGC	20
mRev-erba R	CTGGTCGTGCTGAGAAAGGT	20
mNfil3 F	CTTTCAGGACTACCAGACATCCAA	24
mNfil3 R	GATGCAACTTCCGGCTACCA	20
mPer3 F	GAGAGGCACACTAAGCCCAG	20
mPer3 R	GCCGCGAAGGTATCTGTGTT	20
mCol2a1 F	GAGGCGATGTTGGCGAGAAA	20
mCol2a1 R	GAGGTCCGACTTCTCCCTTC	20
mLAma1 F	GGTCATGCAGAGGCTGACTT	20
mLAma1 R	TGCTGTCAGCTTGTTTCCGA	20
mTnc F	AACGGACTGCCCACATCTCA	20
mTnc R	TCCGGTTCAGCTTCTGTGGTAG	22
mEgfr F	TCATCTGTGCCCAGCAATGT	20
mEgfr R	TTGGCAGACCAGACAGTCAC	20
mCldn1 F	TGGGGCTGATCGCAATCTTT	20
mCldn1 R	CACTAATGTCGCCAGACCTGA	21

3.6. Priprema qRT-PCR

Svaka jažica na ploči koja ide u RT-PCR aparat (7500 Real Time PCR SystemApplied Biosystems Foster City, CA, SAD) sadržavala je uzorak od ukupno 15 µL, od kojih je 12 µL MIX-a i 3 µL uzorka cDNA. MIX se sastojao od 3 µL vode, 7,5 µL SYBR Green boje te po 0,75µL forward i 0,75 µL reverse početnice za svaki pojedinačni uzorak cDNA. Smjesa cDNA je razrijeđena 10 puta, u 200 µL uzorka. Iz te smjese je kasnije uzorkovano po 3 µL za

svaku jažicu PCR ploče. Zbog kontrole uspješnosti qRT-PCR-a, na svaku ploču ispipetirani su i kontrolni uzorci koji su mjerili izražaj gena aktina koji je uvijek jednako izražen u tkivu mokraćnog mjehura u svih miševa te služi kao kontrola izražaja gena u tim tkivima (*housekeeping* gen). Preko gotove ploče lijepi se naljepnica kako uzorci ne bi isparili za vrijeme zagrijavanja te se centrifugira na 3000 okretaja kroz 5 minuta na 4 °C.

3.7. Kvantitativna PCR reakcija u stvarnom vremenu (QRT-PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je laboratorijska metoda koja omogućava *in vitro* višestruko umnažanje određene DNA ili cDNA sekvence iz jako male količine početnog materijala. Ovim se postupkom kopije DNA sekvence eksponencijalno umnožavaju. Ciljni dio molekule DNA koju se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama-početnicama koje su komplementarne krajevima ulomka DNA od interesa, a potrebni su kako bi se DNA polimeraza vezala na njih te nastavila njihovo produljenje. Ova se reakcija odvija u uređaju koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature i vrijeme trajanja određenih dijelova ciklusa (PCR termoblok).

PCR se sastoji od tri osnovna koraka. Prvi korak je fizikalna denaturacija dvolančane DNA u jednolančanu uz pomoć topline, najčešće na temperaturi od 95°C. Drugi korak je hibridizacija komplementarnih primera s jednolančanom DNA za čije se odvijanje temperatura treba sniziti na 55°C. Treći korak je produljenje primera uz pomoć enzima Taq polimeraze, koja ugrađuje nove komplementarne nukleotide stvarajući novi lanac po modelu jednolančane DNA. Optimalna temperatura za djelovanje termostabilne TagQ polimeraze je 72°C. Novonastali produkti dalje služe kao kalup za umnažanje što dovodi do eksponencijalnog umnažanja molekula DNA.

Tri navedena koraka čine jedan ciklus PCR-a na kraju kojega se broj DNA kopija udvostruči, a koji se tijekom reakcije ponavlja 25-45 puta pri čemu se željeni fragment DNA umnoži milijun do milijardu puta. Nakon 45 ciklusa se pojavljuje fenomen platoa kada dolazi do zasićenja (potroška reaktanata) te se gubi efikasnost reakcije.

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) je metoda koja omogućuje kvantifikaciju početne količine DNA u uzorku. Temelji se na prikupljanju podataka pomoću fluorescencijskih boja tijekom qPCR jer su produkti qPCR obilježeni fluorescencijskom bojom. Tijekom PCR ciklusa mjeri se porast

fluorescencije koji je razmjeran količini dobivene DNA tijekom svakog ciklusa. Amplifikacija i detekcija se događaju u jednom koraku.

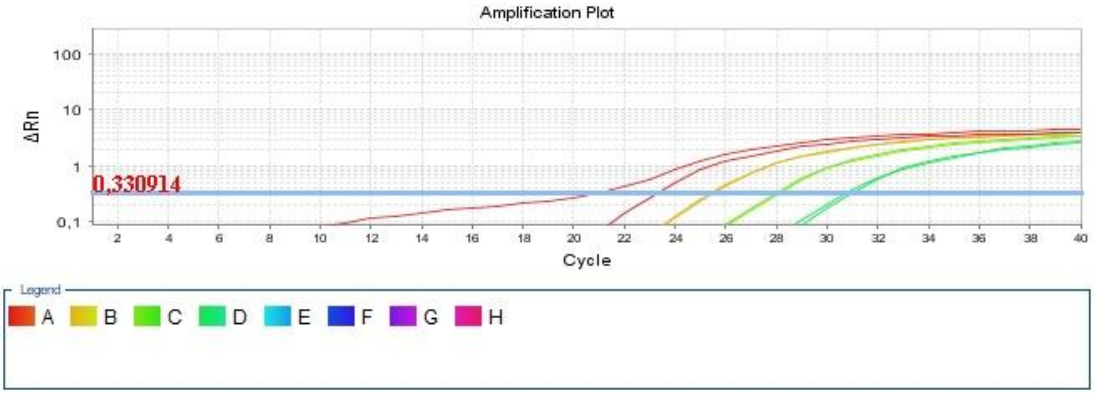
Za istraživanje izražaja gena koristi se lančana reakcija polimeraze spregnuta s reverznom transkripcijom (engl. *reverse transcription* PCR, RT-PCR). Može se izvoditi u jednom koraku ili u dva koraka. Kod RT-PCR u jednom koraku u istoj se epruveti odvijaju reakcije reverzne transkripcije i umnažanja DNA PCR-om. Ovaj način smanjuje eksperimentalne varijacije, no dobivena cDNA se ne može kasnije ponovo analizirati. Kod RT-PCR u dva koraka najprije se u jednoj epruveti provede reakcija reverzne transkripcije te se dobivena cDNA u novoj epruveti analizira PCR-om. RT-PCR-om u dva koraka dobivena cDNA se može više puta analizirati, ali povećava se mogućnost kontaminacije DNA (122).

Postoji više metoda za fluorescencijsko praćenje umnažanja DNA kod qPCR-a. Dvije najviše korištene metode su fluorescencijsko označavanje pomoću SYBR Green I i korištenje probe TaqMan. Fluorescencijska boja SYBR Green I vezana je uz prigušivač (Q- *quencher*), a emitira fluorescenciju tek nakon razdvajanja od njega, tj. vezanjem za dvolančanu (novonastalu) DNA. Kako tijekom PCR-a nastaje sve više dvolančanih produkata, boja SYBR Green se veže na njih te dolazi do povećanja fluorescencije. TaqMan proba je oligonukleotid specifičan za pojedini gen. Kada je proba u intaktnom stanju ne emitira se fluorescencijski signal zbog blizine prigušivača i fluorofora. Proba se dizajnira tako da se komplementarno veže na ciljni gen između para početnica za taj gen. Kako Taq-DNA-polimeraza produljuje početnice, dolazi do probe te odcjepljuje fluorofor s probe. Odvajanjem fluorofora dolazi i do odstranjivanja ostatka probe s DNA te se produljenje lanca nastavlja. Akumulacija PCR produkta se direktno detektira monitoriranjem povećanja fluorescencije.

Rezultati qRT-PCR-a se očitavaju na krivulji umnažanja. Ta krivulja pokazuje porast intenziteta fluorescencije, koji se laserski detektira, u odnosu na broj PCR ciklusa. Početni dio krivulje se naziva lag faza u kojoj fluorescencija umnažanja DNA ne prelazi baznu fluorescenciju (engl. *baseline*). U qPCR reakcijskoj smjesi nalazi se pasivna fluorescencijska boja čija je fluorescencija tijekom cijelog ciklusa PCR-a konstantna. Druga faza započinje kada fluorescencija umnažanja prijeđe fluorescenciju bazne linije te dolazi do eksponencijalnog umnažanja DNA. Treću fazu čine linearna i faza plato-a kada jedan ili više reaktanata bude potrošen (Slika 8.).

qPCR pretpostavlja da je količina amplikona tijekom eksponencijalne faze proporcionalna početnoj količini kalupa. Tako se na krivulji postavlja detekcijski prag (engl.

threshold) koji, nakon što ga intenzitet fluoresciranja prijeđe, definira ciklus prijelaza granične vrijednosti fluorescencije (engl. *threshold cycle*, Ct). Što je ciklus u kojemu se prijeđe prag niži, veća je količina kalupa (početne DNA) jer je prije postignuta granična vrijednost fluorescencije (123).



Slika 8. Krivulje amplifikacije qPCR prikazuju ovisnost fluorescencije o broju ciklusa. Prikazan je semilogaritamski prikaz krivulje amplifikacije s označenom graničnom vrijednošću intenziteta fluorescencije i Ct; ΔRn – fluorescencija umnažanja normalizirana u odnosu na pasivnu fluorescencijsku boju.

Kvantifikacija u qPCR-u može biti apsolutna i relativna. Kod apsolutne kvantifikacije izrađuje se baždarna krivulja koja daje linearni odnos Ct i početne koncentracije DNA ili cDNA pomoću serijskih razrjeđenja standarda poznatih koncentracija. Zatim se pomoću qPCR-a odredi Ct vrijednost uzorka te se iz baždarne krivulje može izračunati početna količina kalupa. Kod relativne kvantifikacije gen od interesa se uspoređuje s vanjskim standardom ili s referentnim uzorkom (kalibratorom) (122).

Kako bi mogli uspoređivati rezultate dobivene iz dvaju različitih uzoraka, dobivene se vrijednosti prethodno trebaju normalizirati. U tu se svrhu koriste endogene kontrole (engl. *endogenous control, reference gene*). Kao endogena kontrola uzimaju se geni čija se ekspresija ne mijenja u uvjetima pri kojima je proveden eksperiment. Često korištene endogene kontrole su tzv. housekeeping geni, geni koji su gotovo uvijek maksimalno aktivni.

PCR uređaj se programirao da, nakon završene PCR reakcije, načini krivulju taljenja DNA (engl. *melting curve*). Ova krivulja pokazuje smanjenje fluorescencije kako se dvostruko zavijena (dsDNA) s inkorporiranom fluorescencijskom bojom razdvaja, odnosno tali u jednolančanu DNA (ssDNA) kako se povećava temperatura kojoj je izložena. To se događa zbog toga što se disocijacijom DNA otpušta fluorescencijska boja. Ovim postupkom

provjeravamo specifičnost produkta jer svi produkti za specifičan par primera moraju imati istu krivulju taljenja koja ovisi o duljini i sadržaju GC trostrukih veza. Ako krivulja nije ista za sve produkte, ukazuje na pojavu *primer-dimera* koji nastaju kada je količina DNA uzorka jako mala zbog čega su primeri u suvišku i koji se, zbog nespecifičnosti, vežu jedni na druge generirajući nespecifični PCR produkt ili na pojavu SNP-a. Ovaj se postupak proveo zato što uvijek postoji mogućnost da čak i odlično dizajnirani primeri formiraju *primer-dimere* ili umnažaju nespecifičan produkt ili da uzorci RNA sadržavaju genomsku DNA, koja se također može umnožavati. U našim su rezultatima svi pokusi pokazali visoku specifičnost prema krivuljama taljenja.

3.8. Obrada podataka

Mjerile su se relativne promjene izražaja ciljanih gena (Per1, Per2, Per3, Reverbα, Spon2, Tef, Arntl, Mup7, Nfil3, Lama 1, TNC, CLDN1, Col2a1 i EGFR) u mokraćnom mjehuru GF i SPF miševa, a kao endogena kontrola za kvantifikaciju korišten je gen za aktin.

Korištena je komparativna Ct metoda ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, ΔΔCt) pri analizi podataka kod relativne kvantifikacije qPCR-a (124). Najprije se gen od interesa (GOI) normalizirao u odnosu na aktin (AKT) u tom uzorku čime se dobila ΔCt vrijednost:

$$\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{AKT}$$

Dobivene ΔCt vrijednosti za uzorak (GF) se zatim uspoređuju sa ΔCt vrijednostima kalibratora (SPF) te se tako dobije –ΔΔCt vrijednost:

$$-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_{GF} - \Delta Ct_{SPF})$$

Zatim se omjer normalizirane količine gena od interesa u GF u odnosu na normaliziranu količinu gena od interesa u SPF dobije uvrštavanjem –ΔΔCt vrijednosti u jednadžbu:

$$\text{Omjer količine gena od interesa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

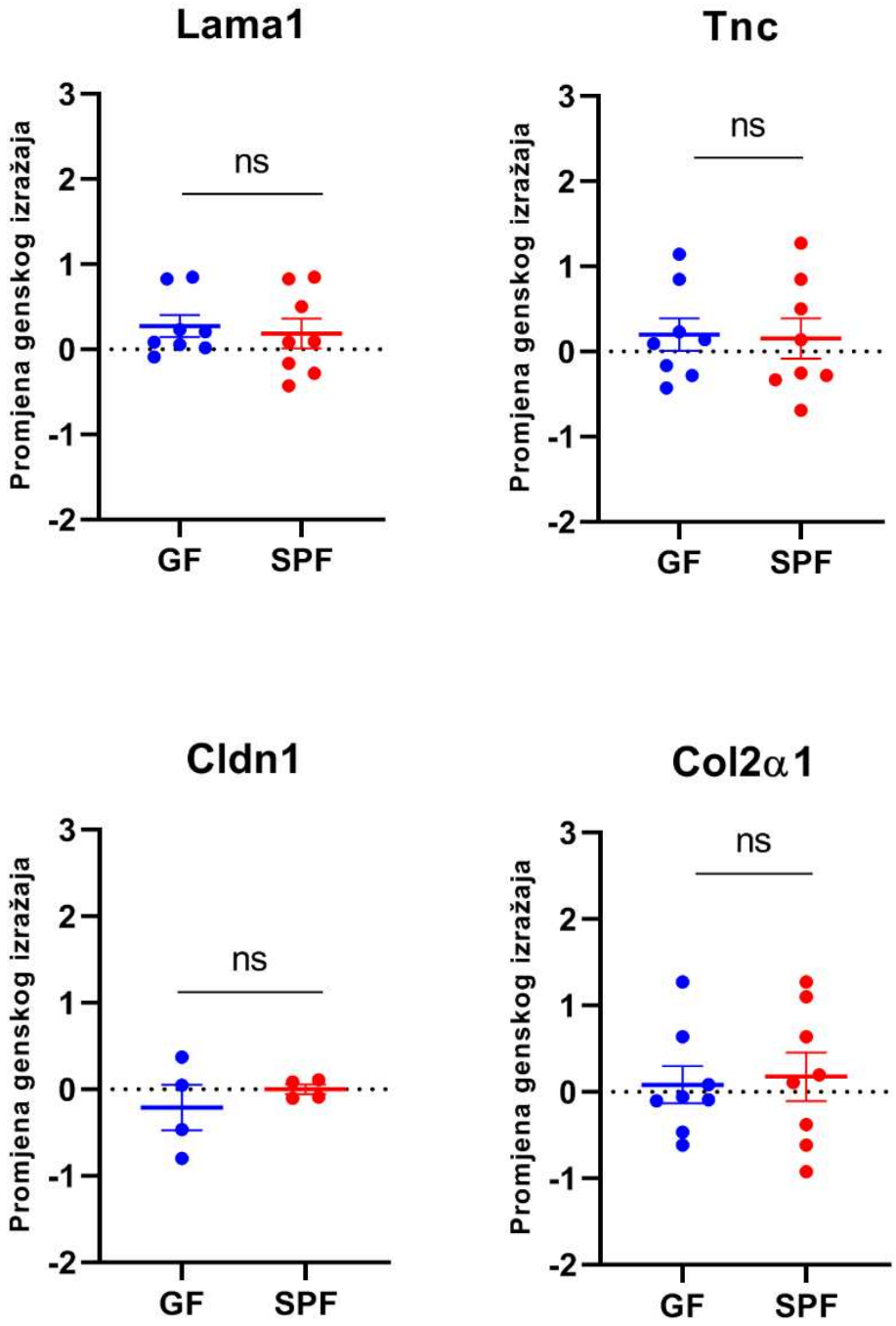
Provjera normalnosti distribucije uzoraka napravljena je preko qqPlota i Shapiro Wilk testom. Uzorci su pokazali normalnu distribuciju te su zatim podvrgnuti studentovom t-testu. Vrijednost od $p<0,05$ smatrana je statistički značajnom. Za grafički prikaz korištena je $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrijednost te je prikazan i +/-sem (standardna pogreška ili engl. *standard error of mean*). Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Uzorci s HIGHSD su izbačeni iz daljnjih analiza, a ako je bio prisutan HIGHSD za aktin, izbačeni su svi geni s tog reda ploče PCR-a. Izračun relativnih

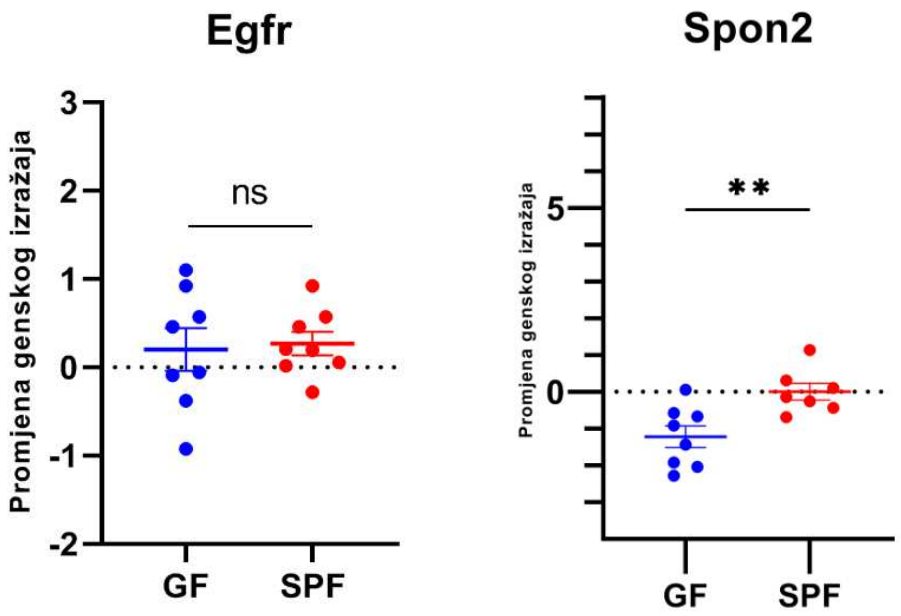
promjena izražaja ciljnih gena napravljen je u programu Microsoft Office Excell 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, SAD). Statistička obrada napravljena je u programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Geni izvanstaničnog matriksa

Nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju gena Lama1, TNC, CLDN1, Col2α1 i EGFR između tkiva mokraćnog mjehura GF i SPF miševa. S druge strane, gen Spon2 pokazuje statistički značajno manji izražaj u mokraćnom mjehuru GF miševa ($p<0,005$)

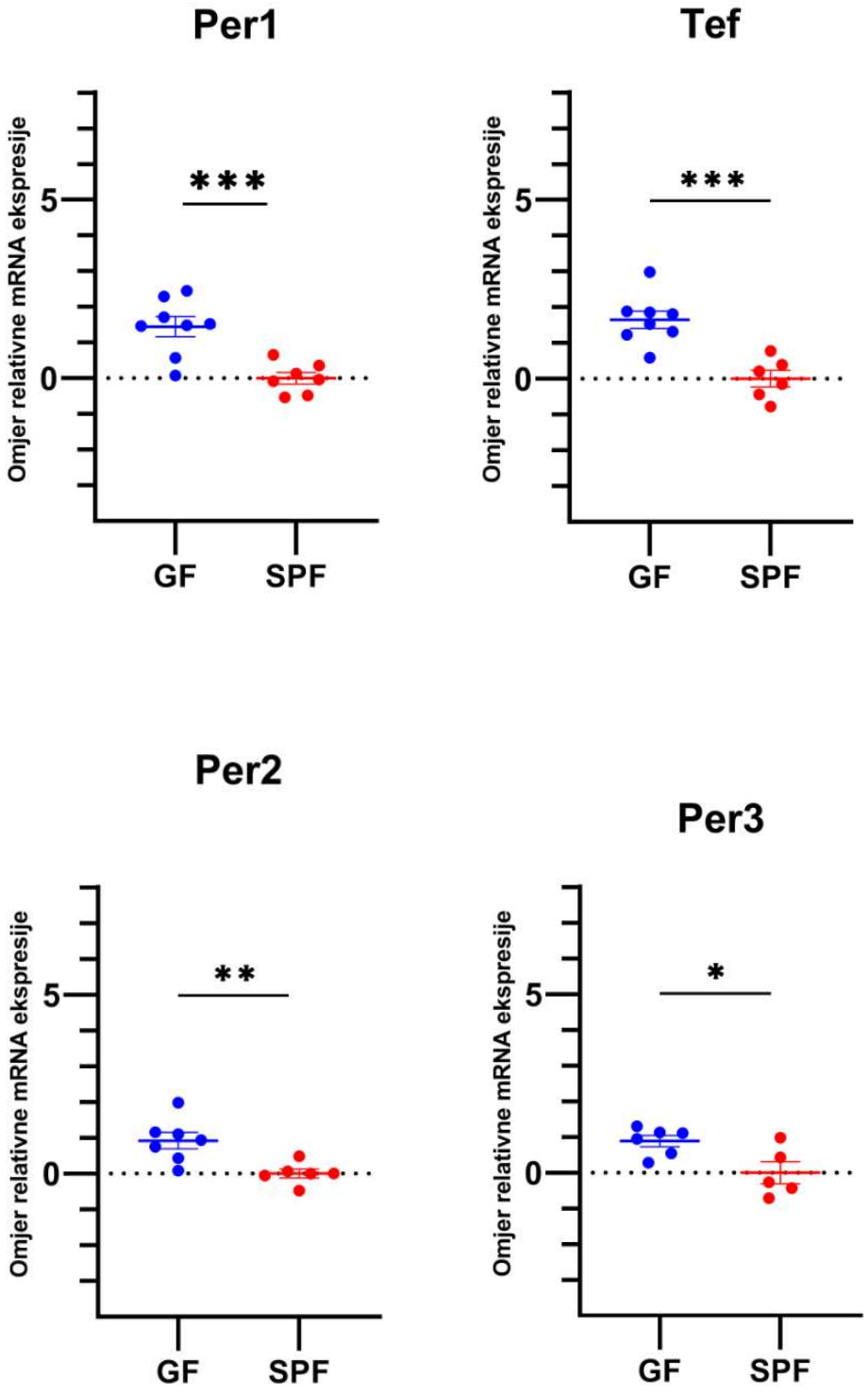


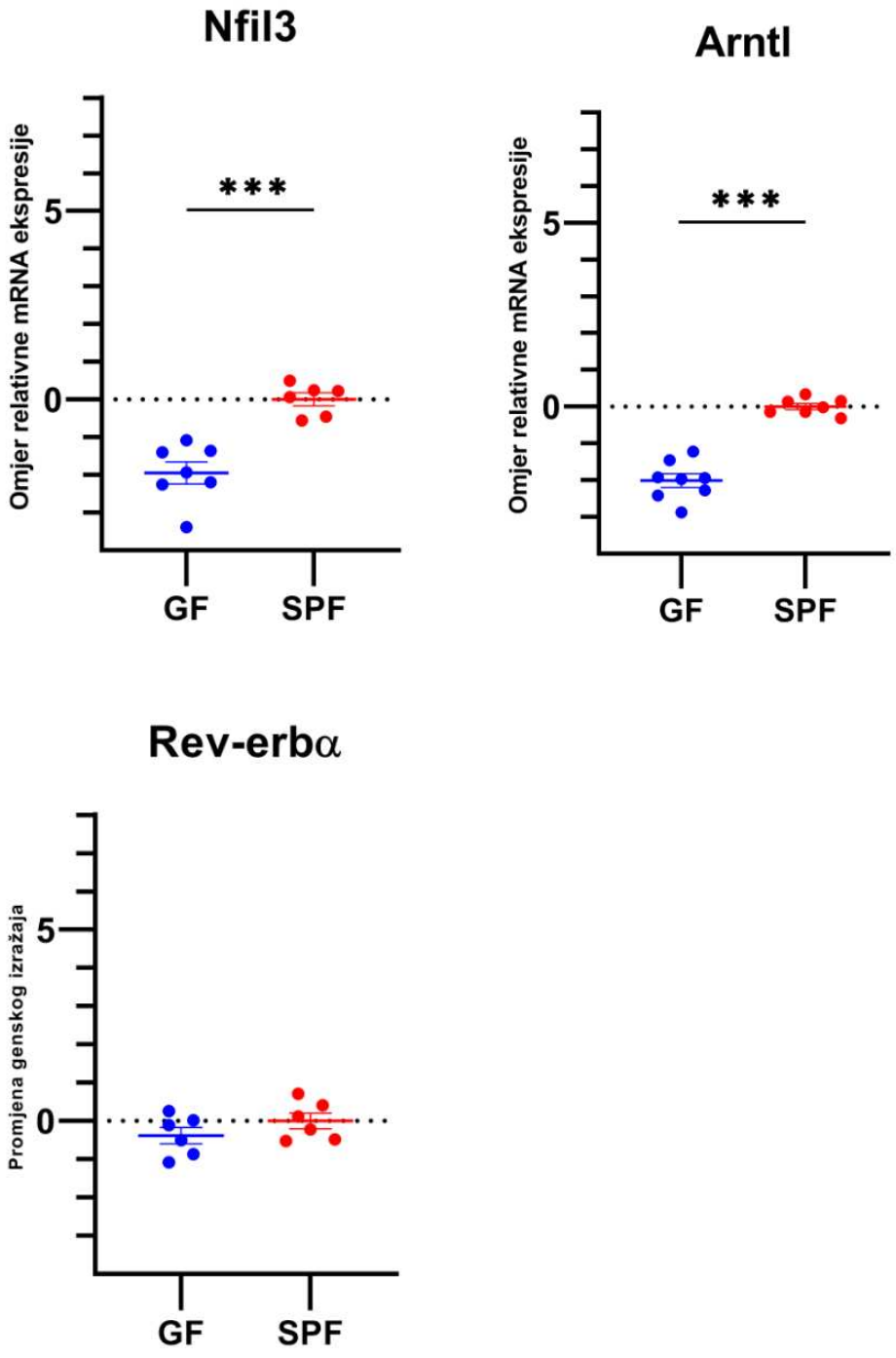


Slika 9. Relativne razlike izražaja gena izvanstanične tvari u GF i SPF miševa. Gen Spon2 pokazuje statistički značajno manji izražaj u mokraćnom mjehuru GF miševa ($p<0,005$), dok geni Lama1, Tnc, Cldn1, Col2α1 i Egfr nisu različito izraženi između GF i SPF grupa miševa. ** $p<0,005$; ns $p>0,05$.

4.2. Geni cirkadijanog ciklusa

Sljedeći geni pokazuju statistički značajno veći izražaj u mokraćnom mjehuru GF miševa**:** Per1 ($p<0,0005$), Tef ($p<0,0005$), Per2 ($p<0,005$) i Per3 ($p<0,05$). Geni Nfil3 i Arntl pokazuju statistički značajno manji izražaj u mokraćnom mjehuru GF miševa ($p<0,0005$). Nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju gena Reverbα između tkiva mokraćnog mjehura GF i SPF miševa.

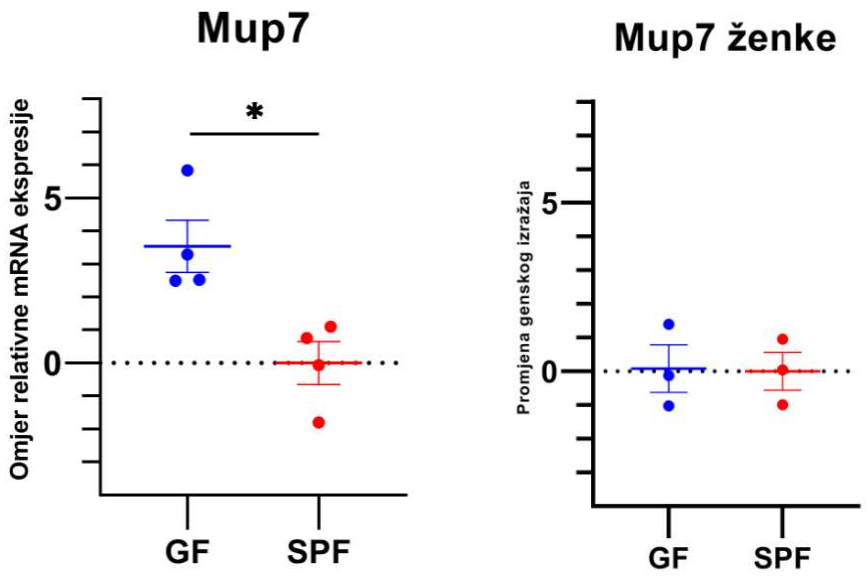




Slika 10. Relativne razlike izražaja gena cirkadijanog ritma između GF i SPF miševa. Geni Per1, Per2, Per3 i Tef imaju veći izražaj u miševa koji su bez mikrobiote (GF). Geni Nfil3 I Arntl imaju smanjen izražaj u GF miševa, dok gen Reverbα nije različito izražen među testiranim grupama. (* p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,0005)

4.3. Mup7 (*major urinary protein 7*)

Gen Mup7 pokazuje statistički značajno veći izražaj u mokraćnom mjehuru GF mužjaka ($p<0,05$), dok u ženki nije pronađena razlika.



Slika 11. Relativne razlike izražaja gena glavnog urinarnog proteina 7 između GF i SPF miševa. Gen glavnog urinarnog proteina Mup7 ima veći izražaj u miševa koji su bez mikrobiote (GF), ali ta razlika nije uočljiva među ženkama. *$p<0,05$.

5. RASPRAVA

Prvi geni odabrani za istraživanje su bili geni koji kodiraju proteine izvanstaničnog matriksa jer su pokazali značajne promjene u izražaju gena u GF miševa u odnosu na SPF miševe na temelju RNAseq analize. Međutim rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoji statistički značajna promjena izražaja Spon2, dok ostali geni koji kodiraju proteine izvanstaničnog matriksa (Lama 1, TNC, CLDN1, Col2a1, EGFR) nisu pokazali statistički značajnu promjenu u ekspresiji. Nakon toga su za istraživanje odabrani geni uključeni u cirkadijani ritam (Per1, Per2, Per3, Tef, Arntl i Nfil3) i Mup7 koji su pokazali statistički značajnu promjenu izražaja gena u mokraćnom mjehuru GF miševa u odnosu na SPF miševe, s izuzetkom gena Reverbα.

5.1. Geni za proteine izvanstaničnog matriksa

Izvanstanični matriks je komponenta svih tkiva i organa u kojoj nisu prisutne stanice. Služi kao potpora stanicama te daje važne biokemijske i biomehaničke signale koji su potrebni za morfogenezu, diferencijaciju i homeostazu tkiva. Izvanstanični matriks je dinamička struktura koja se konstantno remodelira i odgovoran je za elastičnost i čvrstoću tkiva, staničnu migraciju i fiziološku funkciju tkiva i organa (125).

5.1.1. Spon2 (*spondin 2*)

Ovaj gen kodira protein izvanstaničnog matriksa koji je odgovoran za međustaničnu adheziju. Nadalje, ima ulogu i u imunološkom odgovoru, regrutiranju stanica upalnog odgovora te u razvoju neurona (126). Istražuje se kao mogući novi serumski i histološki dijagnostički marker zbog toga što mu je pojačan izražaj u stanicama raznih zloćudnih tumora kao što su hepatocelularni karcinom (127), karcinom jajnika (128), rak prostate (126) i karcinom larinksa (129). Nedavno je otkriveno da je povećana njegova ekspresija u metastatskom kolorektalnom karcinomu te da poboljšava vijabilnost tumorskih stanica, njihovu migraciju i invaziju. Prema jednom su istraživanju pacijenti s visokom ekspresijom SPON2 u primarnom tumoru imali 8 mjeseci kraći period bez metastaza u usporedbi s pacijentima s niskom razinom SPON2. SPON2 služi kao prognostički čimbenik za nastanak kolorektalnih metastaza i preživljenje i može predstavljati metu za terapiju ovog tumora (130). S druge strane, istraživanje metastatskog hepatocelularnog karcinoma je pokazalo da povećan izražaj SPON2 inhibira migraciju i invazivnu sposobnost stanica hepatocelularnog karcinoma (127,131). Ovi naizgled kontradiktorni podatci sugeriraju da je uloga Spon2 u staničnoj migraciji i invaziji kompleksna.

U našem je istraživanju pronađeno da je smanjen izražaj Spon2 gena u stanicama mokraćnog mjehura GF miševa u odnosu na SPF miševe.

5.1.2. Lama1 (*laminin subunit alpha 1*)

Ovaj gen kodira jednu od alfa 1 podjedinica laminina. Laminini su obitelj ekstracelularnih glikoproteina matriksa. Građeni su kao heterotrimeri čije su podjedinice alfa, beta i gama lanac. Ovi proteini tvore važnu komponentu bazalne membrane i imaju ulogu u širokom rasponu bioloških procesa koji uključuju staničnu adheziju, diferencijaciju, migraciju, signaliziranje, rast neurona i metastaziranje (132). Izražaj ovog gena nije bio promijenjen.

5.1.3. Tnc1 (*tenascin 1*)

Ovaj gen kodira protein ekstracelularnog matriksa koji je homoheksamer s podjedinicama povezanim disulfidnom vezom. Uključen je u usmjeravanje migracije neurona i aksona, sinaptičku plastičnost i neuronsku regeneraciju (132). Pokazali smo da je izražaj ovog gena isti (nepromijenjen) između GF I SPF miševa.

5.1.4. Cldn1 (*claudin 1*)

Klaudin je integralni membranski protein i komponenta tijesnih spojeva. Tijesni spojevi predstavljaju jednu od mogućih staničnо-staničnih adhezija epitelnih i endotelnih stanica. Oni formiraju fizikalnu pregradu kako bi spriječili slobodni prolazak vode i otopljenih tvari kroz paracelularni prostor. Mutacije ovog gena rezultiraju neonatalnim sindromom ihtioze-sklerozirajućeg kolangitisa (132). Prema našim rezultatima, odsustvo mikrobiote ne utječe na izražaj ovog gena.

5.1.5. Col2a1 (*collagen type II alpha 1 chain*)

Ovaj gen kodira alfa 1 lanac kolagena tipa dva koji je fibrilarni kolagen i nalazi se u hrskavici i staklastom tijelu u oku. Mutacije ovoga gena su povezane s ahondrogenezom, hondrodisplazijom i ranim nastupom nasljednog osteoartritisa (133). Iako je RNAseq analiza pokazala promijenjen izražaj ovog gena, testiranje većeg broja životinja qPCR-om nije potvrdila postojanje razlika.

5.1.6. Egfr (*epidermal growth factor receptor*)

Ovaj gen kodira transmembranski glikoprotein koji je član porodice protein kinaza. Ovaj protein je receptor za epidermalne faktore rasta koji se nalazi na površini stanica. Vezanje liganda izaziva dimerizaciju receptora i autofosforilaciju tirozina što vodi staničnog proliferaciji. Mutacije ovog gena su povezane s karcinomom pluća (132).

U našem istraživanju nije pronađena razlika u izražaju gena LAMA1, TNC, CLDN1, Col2α1 i EGFR u mokraćnom mjehuru GF miševa u odnosu na SPF miševe. S druge pak strane, gen Spon2, koji je upleten u procese metastaziranja raka jetre i debelog crijeva, je statistički manje izražen u mokraćnom mjehuru GF miševa. To kazuje da bi možda, ovisno o nazočnosti određene mikrobiote, mogao imati utjecaja na metastaziranje zloćudnih tumora mokraćnog mjehura, a što bi trebalo provjeriti dodatnim pokusima. Nadalje, iako su suradnici na projektu (B.R. i J.T.) uočili razlike u težini mokraćnog mjehura između GF I SPF miševa, ali analiza izražaja svih gena nije pokazala koji je mogući uzrok tim razlikama.

5.2. Geni cirkadijanog ciklusa

Ovo je istraživanje pokazalo da mikrobiom regulira ekspresiju određenih gena mokraćnog mjehura. Što je zanimljivo, razlike su pronađene u genima koji kontroliraju cirkadijani ciklus.

Rezultati ovoga rada prvi put pokazuju da mikrobiom mokraćnog mjehura utječe na ekspresiju gena cirkadijanog ritma u mokraćnom mjehuru. Kada se uzme u obzir činjenica da je 43% svih protein-kodirajućih gena pod utjecajem gena cirkadijanog sata (134), uočava se važnost ovoga otkrića za daljnja istraživanja kompleksnog međudjelovanja mikrobioma i domaćina u zdravlju i bolesti.

Poput mnogih drugih fizioloških procesa, unos tekućine, produkcija urina i pohrana urina pokazuju izrazite dnevne varijacije. Produkcija urina i mokrenje moraju dominirati u aktivnoj fazi dana, a povećana pohrana urina i smanjena frekvencija uriniranja moraju biti smanjeni tijekom faze odmora da bi se osigurao kvalitetniji san i odmor. Dakle, poremećaj ove homeostatske regulacije utječe na dobrobit organizma. Na primjer, nokturija smanjuje kvalitetu života i utječe na povećani morbiditet i mortalitet, posebice u starijoj populaciji (135). Da bi se otkrio mehanizam odgovoran za te dnevne varijacije u mokraćnom sustavu, provedena su istraživanja na tzv. *knock out* miševima. Delecijom gena Clock u miševa se pojavio parcijalni dijabetes insipidus, disregulacija ekskrecije natrija i značajno smanjenje krvnog tlaka (136). U drugom su istraživanju korišteni miševi s deletiranim Per1 i Per2 genom koji su pokazali disritmiju dnevnih varijacija nakon samo 2 dana bivanja u potpunom mraku (137) što je pokazalo da su geni cirkadijanog sata važni za optimalnu funkciju mokraćnog sustava.

5.2.1. Per1, Per2 i Per3 *(period circadian clock)*

Geni Per1, Per2 i Per3 čine porodicu gena koji su izraženi u cirkadijanom ritmu u suprahijazmatskoj jezgri, održavajući ritam promjena od približno 24 sata. Geni u ovoj porodici kodiraju komponente cirkadijanog ritma koje utječu na lokomotornu aktivnost, metabolizam, ponašanje i spavanje. Ovome se genu povećava ekspresija putem CLOCK/ARNTL heterodimera, a potom se ova ekspresija smanjuje povratnom spregom koristeći PER/CRY heterodimere koji se onda ponašaju kao transkripcijski represori CLOCK/ARNTL heterodimera.

Polimorfizmi ovih gena mogu povećati rizik dobivanja određenih vrsta zloćudnih tumora (132). Naime, nekoliko studija je pokazalo da je smanjena ekspresija Per1 gena česta u ljudskim tumorima, kao što je: rak dojke i endometrija (138-141); karcinomi glave i vrata (142); rak prostate i kolorektalni karcinom (143,144). Gery *i sur.* sugeriraju da bi regulacija Per1 ekspresije mogla biti korisna u liječenju zloćudnih tumora. Delecija Per1 u tumorskim stanicama koje se zatim injiciraju u miševe dovodi do smanjene apoptoze, dok su stanična proliferacija i nastanak tumora pospješeni (143).

Također, ekspresija Per2 gena smanjena je u određenim tumorskim stanicama (limfom, akutna mijeloična leukemija), što sugerira da je Per2 važan za ispravno funkcioniranje stanice te da njegova smanjena razina promovira tumorsku progresiju (145). Mutacije Per2 gena uzrokuju poremećaje spavanja (146).

U ovom je istraživanju pronađen povećan izražaj Per1 i Per2 u mokraćnom mjehuru GF miševa, što je u skladu s istraživanjima provedenim na GF miševima na uzorcima jetrenog tkiva (147) te s istraživanjem na ileumu i debelom crijevu antibiotski tretiranih miševa (148) Gen Per3 je također pokazao veći izražaj u GF miševa, što se ne spominje u dosadašnjoj literaturi.

5.2.2. Nfil3 (*nuclear faktor, interleukin 3 regulated*)

Gen Nfil3 je transkripcijski regulator koji se kao homodimer veže na aktivirajuća mjesta transkripcijskih faktora u mnogobrojnim promotorima. Ovaj protein smanjuje izražaj Per2 i ključan je za održavanje cirkadijanog ritma ljudi (149,150). Kao što je navedeno u uvodu, NFIL3 predstavlja ključnu molekularnu poveznicu između mikrobiote, cirkadijanog ritma i domaćinova metabolizma. Mononuklearne stanice lamine proprije u crijevima osoba s upalnim crijevnim bolestima imaju manju količinu Nfil3 proteina (151). Glavni je regulator

IL3-ovisnog preživljavanja B stanica te je ključan pri promjeni razreda imunoglobulina iz IgG u IgE (152).

U ovom je istraživanju pronađen smanjen izražaj gena Nfil3 u mokraćnom mjehuru GF miševa, što je u skladu s istraživanjima provedenim na tkivu crijeva i tkivu jetre GF miševa (153) te na tkivu ileuma i debelog crijeva antibiotski tretiranih miševa (148).

5.2.3. Arntl (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1*) ili Bmal1 (*brain and muscle ARNT-like 1*)

Arntl kodira transkripcijski faktor koji ima važnu ulogu kao jedan od pozitivnih elemenata u autoregulaciji stvaranja molekularnog cirkadijanog ritma. Istraživanja su otkrila da je Arntl jedini gen bez kojeg ljudski cirkadijani sat ne može funkcionirati (154). Naime, miševi s deletiranim Arntl su pokazali kompletni gubitak cirkadijanog ritma što rezultira neritmičnim ponašanjem i molekularnim varijacijama (155), ali isto tako, miševi su imali reproduktivne probleme (156) i progresivnu artropatiju (157). Arntl je također identificiran kao kandidatni gen za razvoj hipertenzije, dijabetesa mellitusa i pretilosti (158,159). Mutacije ovoga gena povezane su s neplodnošću, problemima u glukoneogenezi i lipogenezi te s promijenjenim obrascem spavanja. U istraživanjima cjelogenomskog profiliranja, pokazano je da Arntl utječe na više od 150 mjesta u ljudskom genomu, uključujući sve gene cirkadijanog ritma i gene koji kodiraju proteine zadužene za regulaciju metabolizma (160). Smanjena mu je ekspresija u pacijenata s bipolarnim poremećajem (161). U jednom je istraživanju otkriveno i da je uključen u regulaciju metabolizma ksenobiotika (162).

U ovom je istraživanju pronađen smanjen izražaj gena Arntl u mokraćnom mjehuru GF miševa što je u skladu s istraživanjima provedenima na tkivu jetre i mozga GF miševa (54,153) te ileuma i kolona antibiotski tretiranih miševa (148).

5.2.4. Tef (*thyrotroph embryonic factor*)

Gen Tef kodira transkripcijski faktor koji je dio složenog mehanizma cirkadijanog ritma koji služi regulaciji gena kontroliranih cirkadijanim satom (163). U normalnim stanicama regulira apoptozu hematopoetskih progenitorskih stanica i kontrolira proliferaciju hematopoetskih stanica (164). U fibroblastima miševa, TEF kontrolira distribuciju aktina i oblik stanica. Tef se također povezuje s razvojem depresije (165). Njegova je ekspresija smanjena u tumorima mokraćnog mjehura što pogoduje proliferaciji stanica i tumorigenezi. Prekomjerno izražen TEF značajno inhibira tranziciju iz G1 u S fazu staničnog ciklusa kao i tumorigenezu regulacijom AKT/FOXO signalnog puta. Stanice u kojima je utišan TEF su

pokazale suprotne rezultate. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu TEF-a kao dijagnostičkog markera i potencijalne mete u liječenju tumora mokraćnog mjehura (166).

U našem je istraživanju pronađeno da je ekspresija Tef-a povećana u stanicama mokraćnog mjehura GF miševa u usporedbi sa SPF miševima što je u skladu s pronalaskom povećane ekspresije Tef-a u jetrenom tkivu GF miševa (147).

Ovo je istraživanje pronašlo promjene izražaja gena cirkadijanog (dnevno-noćnog) ritma u mokraćnom mjehuru miša u ovisnosti o mikrobioti. Slične promjene aktivnosti gena cirkadijanog ritma primijećene su u nekim drugim organima (crijeva, jetra), ali njihovo cikličko mijenjanje u mokraćnom mjehuru je slabo poznato iako je možda u podlozi različitog dnevno-noćnog mokrenja kao i nekih mikcijskih poremećaja. Najzanimljivija je spoznaja da su geni koji kontroliraju dnevno-noćni ritam u mjehuru miša pod utjecajem bakterija (i drugih mikroba), a ne samo "standardnih" regulatora tog ritma poput količine prisutnog svjetla. Daljnja istraživanja trebaju pronaći mogući klinički značaj navedenih otkrića.

5.2.5. Reverbα

Reverbα gen kodira transkripcijski faktor koji je i nuklearni receptor. To je ligand-osjetljivi transkripcijski faktor koji negativno regulira ekspresiju proteina središnjeg sata, točnije Arntl1 te tako upravlja cirkadijanom ritmičnošću. Također regulira gene uključene u metaboličke funkcije, uključujući metabolizam lipida i žučnih kiselina, adipogenezu, glukoneogenezu i upalni odgovor makrofaga (132).

U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji Reverbα gena u mokraćnom mjehuru GF miševa u odnosu na SPF miševe.

5.3. Mup7 (*major urinary protein 7*)

Osim gena uključenih u cirkadijani ciklus, razliku u ekspresiji pokazao je i gen Mup7.

Mup7 je dio Mup (*Major urinary proteins*) obitelji proteina koji se nalaze u urinu miševa. Oni služe kao nosači feromona te tako posreduju u kemijskom signaliziranju i prijenosu socijalnih signala među životinjama kao što su identitet, označavanje teritorija i odabir partnera (167). Ekspresija MUP-a u miševa je stimulirana androgenima zbog čega su veće količine MUP-a prisutne u mužjaka nego u ženki. Jedna od glavnih funkcija MUP proteina je promoviranje agresivnog ponašanja vezanjem za vomeronazalne receptore u nosu (168).

U našem su istraživanju mužjaci GF miševa pokazali veću ekspresiju Mup7 gena u mokraćnom mjehuru u odnosu na SPF mužjake, dok ženke nisu pokazale statistički značajne razlike. U istraživanju iz veljače 2019. godine je pronađeno da su Mup geni smanjeno izraženi u GF mužjaka u odnosu na konvencionalno uzgajane mužjake (169). Potrebna su daljnja istraživanja da bi se razjasnila interakcija mikrobioma i Mup7 gena.

5.4. Ograničenja provedenog istraživanja

Ograničenja ove studije su mali broj testiranih uzoraka te postojanje duplikata s HIGHSD tijekom obrade PCR zbog čega su izbačeni iz analiza. Nadalje, ne postoji mogućnost usporedbe nekih rezultata s prethodnim rezultatima zbog nepostojanja drugih studija koje su proučavale ovu temu.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Mikrobiota regulira izražaj mnogih gena u mokraćnom mjehuru miša.
2. Odsutnost mikrobiote (u germ free miševima) dovela je do promjene aktivnosti gena koji kontroliraju cirkadijani ritam. Tako je:
    - statistički značajno povećan izražaj gena Per1, Per2, Per3 i Tef;
    - statistički značajno smanjen izražaj gena Nfil3 i Arntl;
    - gen Reverbα ostao je nepromijenjen.
3. Aktivnost većine testiranih gena izvanstanične tvari (Lama1, Tnc, Cldn1, Col2α1, Egfr) nije regulirana mikrobiotom, dok je aktivnost gena Spon2 statistički značajno smanjena u odsutnosti mikrobiote.
4. Genski izražaj feromonskog proteina Mup7 statistički je značajno povećan u mokraćnom mjehuru GF mužjaka.

7. REFERENCE

1. Antal I, Jelić M, Sila S, Kolaček S, Tambić Andrašević A. Ljudska mikrobiota I mikrobiom. Acta med Croatica. 2019;73:3-13.
2. Rosner JL. Ten Times More Microbial Cells that Body Cells in Humans? Microbe. 2014;2:47.
3. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. Biochem J. 2017;474(11):1823-36.
4. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS i sur. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science. 2006;312(5778):1355-9.
5. Moselio (Elio) Schaechter, Stanley Maloy. Power of Ten [Internet]. Washington DC: American Society For Microbiology; 15. srpnja 2010 [citirano 29.svibnja 2019]. Dostupno na: https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2010/07/power-of-ten.html.
6. Savage DC. Microbial ecology of gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol. 1977;31:107-33.
7. Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. Am J Clin Nutr. 1972;25(12):1292-4.
8. Dobzhansky. Genetics of the evolutionary process. New York: Columbia University Press; 1970.
9. Baohong W, Mingfei Y, Longxian L, Zongxin L, Lanjuan L. The Human Microbiota in Health and Disease. Engineering. 2017;3(1):71-82.
10. Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in Allergy and Asthma and the Emerging Relationship with the Gut Microbiome. Cell Host Microbe. 2015;17(5):592-602.
11. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. Therap Adv Gastroenterol. 2013;6(4):295-308.
12. Huttenhower C, Gevers D, Knight R i sur. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012;486:207-14.
13. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G i sur. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. Nature. 2017;550:61-6.
14. Proctor LM. The human microbiome project in 2011 and beyond. Cell Host Microbe. 2011;10(4):287-91.
15. Shannon MB, Limeira R, Johansen D, Gao X, Lin H, Dong Q i sur. Bladder urinary oxygen tension is correlated with urinary microbiota composition. Int Urogynecol J. 2019.doi:10.1007/s00192-019-03931-y.
16. Gilber JA. Our unique microbial identity. Genome Biol. 2015;16(1):97.

17. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012;486(7402):207-14.
18. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. Genome Med 2016;8(1):51.
19. Davies J. In a map for human life, count the microbes, too. Science. 2001;291:2316.
20. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. Nature. 2007;449(7164):804-10.
21. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA i sur. The NIH Human Microbiome Project. Genome research. 2009;19(12):2317-23.
22. hmpdacc.org: The Human Microbiome Project [Internet]. Maryland: Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine; ©2019 [citirano 29.svibnja 2019]. Dostupno na: https://hmpdacc.org/hmp/.
23. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. PloS one. 2012.doi:10.1371/journal.pone.0034242.
24. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9:565-76.
25. Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Dietinduced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. Nutrients. 2012;4:1095-119.
26. Qin J i sur. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010;464:59–65.
27. Chang C i Lin H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2016;30:3–15.
28. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. Nature. 2012;489:231-41.
29. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015;21(29):8787-803.
30. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Science. 2012;336:1268–73.
31. Natividad JMM i Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. Pharmacol Res. 2013;69:42–51.
32. Bäumler AJ i Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. Nature. 2016;535:85–93.

33. El Aidy S, van Baarlen P, Derrien M, Lindenbergh-Kortleve DJ, Hooiveld G, Levenez F i sur. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. Mucosal immunology. 2012;5(5):567-79.
34. Jimenez E, Marin ML, Martin R i sur. Is meconium from healthy newborns actually sterile? Res Microbiol. 2008;159:187-93.
35. Avershina E, Storro O, Oien T, Johnsen R, Pope P, Rudi K. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. FEMS microbiol ecol. 2014;87(1):280-90.
36. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C i sur. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. PloS one. 2012.doi:10.1371/journal.pone.0036466.
37. Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N i sur. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. Microbial ecology in health and disease. 2015.doi:10.3402/mehd.v26.26050.
38. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R i sur. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011.doi:10.1073/pnas.1000081107.
39. Turnbaugh PJ i sur. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature. 2009;457:480-4.
40. Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. Lupus. 2014;23(6):518-26.
41. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A i sur. Towards the human colorectal cancer microbiome. PloS one. 2011.doi:10.1371/journal.pone.0020447.
42. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P i sur. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. PloS one. 2011.doi:10.1371/journal.pone.0016393.
43. Schulz MD, Atay C, Heringer J, Romrig FK, Schwitalla S, Aydin B i sur. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. Nature. 2014;514(7523):508-12.
44. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV i sur. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. Genome biology. 2012.doi: 10.1186/gb-2012-13-9-r79.

45. Rubin DC, Shaker A, Levin MS. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. Frontiers in immunology. 2012;3:107.
46. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M i sur. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. Science. 2012;338:120–3.
47. Wu P, Zhang G, Zhao J i sur. Profiling the urinary microbiota in male patients with bladder cancer in China. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:167
48. Porter CM, Shrestha E, Peiffer LB, Sfanos KS. The microbiome in prostate inflammation and prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2018;21:345–54.
49. Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. Nat Rev Genet. 2008;9:764-75.
50. Martino TA, Oudit GY, Herzenberg AM, Tata N, Koletar MM, Kabir GM i sur. Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;294:1675-83.
51. PER1 gene [Internet]. California: LifeMap Sciences, Inc.; © 1996-2019 [citirano 23. lipnja 2019]. Dostupno na: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PER1.
52. Panda S, Hogenesch JB. It's all in the timing: many clocks, many outputs. Journal of biological rhythms. 2004;19(5):374-87.
53. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F i sur. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. Cell. 2008;134(2):317-28.
54. Leone V, Gibbons SM, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM i sur. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. Cell host & microbe. 2015;17(5):681-9.
55. Liang X, Bushman FD, FitzGerald GA. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(33):10479-84.
56. Murakami K, Yurgel ME, Stahl BA, Masek P, Mehta A, Heidker R i sur. Translin Is Required for Metabolic Regulation of Sleep. Curr biol. 2016;26(7):972-80.
57. Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, Engen PA, Keshavarzian A. Circadian Rhythm and the Gut Microbiome. Int Rev Neurobiol. 2016;131:193-205.
58. Thaiss CA, Levy M, Korem T, Dohnalova L, Shapiro H, Jaitin DA i sur. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. Cell. 2016;167(6):1495-510.

59. Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. Genes Dev. 2001;15(8):995-1006.
60. Yu X, Wang Y, Deng M, Li Y, Ruhn KA, Zhang CC i sur. The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. eLife. 2014.doi:10.7554/eLife.04406
61. Yu X, Rollins D, Ruhn KA, Stubblefield JJ, Green CB, Kashiwada M i sur. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. Science. 2013;342(6159):727-30.
62. Wang Y, Kuang Z, Yu X, Ruhn KA, Kubo M, Hooper LV. The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. Science. 2017;357(6354):912-6.
63. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A i sur. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(44):15718-23.
64. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444:1027-31.
65. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM i sur. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. J Clin Microbiol. 2014;52:871–6.
66. Anderson M, Bollinger D, Hagler A i sur. Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens. J Clin Microbiol. 2004;42:753–8.
67. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, Fitzgerald M i sur. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. J Clin Microbiol. 2012;50:1376-83.
68. Lewis DA, Brown R, Williams J i sur. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:41.
69. Pearce MM, Zilliox MJ, Rosenfeld AB i sur. The female urinary microbiome in urgency urinary incontinence. Am J Obstet Gynecol. 2015.doi:10.1016/j.ajog.2015.07.009.
70. Shrestha E, White JR, Yu SH i sur. Profiling the urinary microbiome in men with positive versus negative biopsies for prostate cancer. J Urol. 2018;199:161-71.
71. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev. 1991;4:485-502.
72. Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. Clin Microbiol Rev. 1999;12:97-111.

73. Roy S, Trinchieri G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2017;17:271-85.
74. Garrett WS. Cancer and the microbiota. Science. 2015;348:80-6.
75. Alfano M, Canducci F, Nebuloni M, Clementi M, Montorsi F, Salonia A. The interplay of extracellular matrix and microbiome in urothelial bladder cancer. Nat Rev Urol. 2016;13:77-90.
76. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L i sur. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. Science. 2018;359:91-7.
77. Markowski MC, Boorjian SA, Burton JP, Hahn NM, Ingersoll MA, Maleki Vareki S i sur. The Microbiome and Genitourinary Cancer: A Collaborative Review. Eur Urol. 2019;75(4):637-46.
78. Pettenati C, Ingersoll MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. Nat Rev Urol. 2018;15:615-25.
79. Thomas-White K, Forster SC, Kumar N i sur. Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. Nat Commun. 2018;9:1557.
80. Kennedy EA, King KY,Baldridge MT. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. Front Physiol. 2018;9:1534.
81. Fontaine CA, Skorupski AM, Vowles CJ,Anderson NE, Poe SA, Eaton KA. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit. Gut Microbes. 2015;6(4):225-33.
82. Nicklas W, Keubler L, Bleich A. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents. ILAR J. 2015;56(2):241-9.
83. Yi P, Li LJ. The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. Vet Microbiol. 2012;157:1–7.
84. Al-Asmakh M, Zadjali F. Use of germ-free animal models in microbiota-related research. J Microbiol Biotechnol. 2015;25:1583-8.
85. Philip Dubé. What are germ-free mice and how are they sourced? [Internet]. New York: Taconic Biosciences, Inc.; 31. ožujka 2017 [citirano 10.svibnja 2019]. Dostupno na: https://www.taconic.com/taconic-insights/microbiome-and-germ-free/what-are-germ-free-mice.html.
86. Al-Asmakh M, Anuar F, Zadjali F, Rafter J, Pettersson S. Gut microbial communities modulating brain development and function. Gut Microbes. 2012;3:366-73.

87. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A i sur. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:3047-52.
88. McVey Neufeld KA, Perez-Burgos A, Mao YK, Bienenstock J, Kunze WA. The gut microbiome restores intrinsic and extrinsic nerve function in germ-free mice accompanied by changes in calbindin. Neurogastroenterol Motil. 2015;27:627-36.
89. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. Neurogastroenterol Motil. 2011;23:255-64.
90. Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, Nedorost L, Rossman P, Poledne R i sur. Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. J Atheroscler Thromb. 2010;17:796-804.
91. Al-Asmakh M, Stukenborg JB, Reda A, Anuar F, Strand ML, Hedin L i sur. The gut microbiota and developmental programming of the testis in mice. PLoS One. 2014.doi:10.1371/journal.pone.0103809.
92. Shimizu K, Muranaka Y, Fujimura R, Ishida H, Tazume S, Shimamura T. Normalization of reproductive function in germfree mice following bacterial contamination. Exp Anim. 1998;47:151-8.
93. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G i sur. Host-gut microbiota metabolic interactions. Science. 2012;336:1262-7.
94. Sjogren K, Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK i sur. The gut microbiota regulates bone mass in mice. J Bone Miner Res. 2012;27:1357-67.
95. Schubert AM, Sinani H, Schloss PD. Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against clostridium difficile. mBio. 2015.doi:10.1128/mBio.00974-15.
96. Zackular JP, Baxter NT, Chen GY, Schloss PD. Manipulation of the gut microbiota reveals role in colon tumorigenesis. mSphere. 2015.doi:10.1128/mSphere.00001-15.
97. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS i sur. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract in fluenza A virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:5354-9.
98. Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. Nat Commun. 2017;8:1512.

99. Oh JE, Kim BC, Chang DH, Kwon M, Lee SY, Kang D i sur. Dysbiosis-induced IL-33 contributes to impaired antiviral immunity in the genital mucosa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:E762-71.
100. Zhang L, Huang Y, Zhou Y, Buckley T, Wang H. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3659-66.
101. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. Semin Immunol. 2006;19:59-69.
102. Jim Yeadon. The difference between 'germ free' and 'specific-pathogen-free' mice [Internet]. Bar Harbor: The Jackson Laboratory; 17. svibnja 2013 [citirano 1.svibnja 2019]. Dostupno na: https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2013/may/the-difference-between-germ-free-and-specific-pathogen-free-mice.
103. Grover M, Kashyap PC. Germ free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. Neurogastroenterol Motil. 2014;26(6):745-8.
104. Yamamoto M, Yamaguchi R, Munakata K, Takashima K i sur. A microarray analysis of gnotobiotic mice indicating that microbial exposure during the neonatal period plays an essential role in immune system development. BMC Genom. 2012;13:335.
105. El Aidy S, van Baarlen P, Derrien M, Lindenbergh-Kortleve DJ, Larsson E, Tremaroli V i sur. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through myd88. Gut. 2012;61:1124-31.
106. Hooiveld G, Levenez F, Dore J, Dekker J, Samsom JN, Nieuwenhuis EE i sur. Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. Mucosal Immunol. 2012;5:567–79.
107. Janeckova L, Kostovcikova K, Svec J, Stastna M, Strnad H, Kolar M i sur. Unique Gene Expression Signatures in the Intestinal Mucosa and Organoids Derived from Germ-Free and Monoassociated Mice. Int J Mol Sci. 2019.doi:10.3390/ijms20071581.
108. El Aidy S, Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Louis P, Kleerebezem M. Intestinal colonization: How key microbial players become established in this dynamic process: Microbial metabolic activities and the interplay between the host and microbes. Bioessays. 2013;35:913-23.
109. Wostmann BS. Germfree and Gnotobiotic Animal Models: Background and Applications. 1. izdanje. Florida: CRC Press; 1996.

110. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an ige production system fully susceptible to oral tolerance induction. J Immunol. 1997;159:1739-45.
111. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L i sur. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. Cell Mol Immunol. 2011;8:110-20.
112. Charles River. Mouse Models-Health Profiles [Internet]. Wilmington: Charles River Laboratories; © 2019. Dostupno na: https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/spf-sopf-health-profiles-charles-river-europe-mice.pdf.
113. Federation of European Laboratory Animal Science Associations [Internet]. Eye Suffolk: FELASA; 1994 [citirano 15.svibnja 2019]. Dostupno na: http://www.felasa.eu/.
114. Chu Y, Corey DR. RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. Nucleic Acid Ther. 2012;22(4):271–4.
115. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Han B, Jing X i sur. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. Nature. 2009;458(7234):97–101.
116. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. Nat Protoc. 2012;7(8):1534–50.
117. Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, Kalhor R, Yang JL, Ferrante TC i sur. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. Science. 2014;343(6177):1360–3.
118. Kukurba KR, Montgomery SB. RNA Sequencing and Analysis. Cold Spring Harb Protoc. 2015;(11):951–69.
119. Cooper GM, Hausman RE. The Cell-A Molecular Approach. 7. izdanje. New York: Oxford University Press; 2018.
120. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Lin B, Birket SE i sur. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. Nature. 2018;560(7718):319-24.
121. Plasschaert LW, Žilionis R, Choo-Wing R, Savova V, Knehr J, Roma G i sur. A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. Nature. 2018;560(7718):377-81.

122. Wong ML i Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques.2005;39:75-85.
123. Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C i Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. BioMed Central. 2007;8:1-16.
124. Livak KJ i Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^ΔΔCT Method. Methods. 2001;25:402-8.
125. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci. 2010;123(24):4195-200.
126. Lucarelli G, Rutigliano M, Bettocchi C, Palazzo S, Vavallo A, Galleggiante V i sur. Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. J Urol. 2013;190:2271-7.
127. Liao CH, Yeh SC, Huang YH, Chen RN, Tsai MM, Chen WJ i sur. Positive regulation of spondin 2 by thyroid hormone is associated with cell migration and invasion. Endocr Relat Cancer. 2010;17:99-111.
128. Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe JD i sur. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. J Natl Cancer Inst. 2010;102:26-38.
129. Ni H, Ni T, Feng J, Bian T, Liu Y, Zhang J. Spondin-2 is a novel diagnostic biomarker for laryngeal squamous cell carcinoma. Pathol Res Pract. 2019;215:286-91.
130. Schmid F, Wang Q, Huska MR, Andrade-Navarro MA, Lemm M, Fichtner I i sur. SPON2, a newly identified target gene of MACC1, drives colorectal cancer metastasis in mice and is prognostic for colorectal cancer patient survival. Oncogene. 2016;35:5942-52.
131. Zhang YL, Li Q, Yang XM i sur. SPON2 promotes M1-like macrophage recruitment and inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by distinct integrin-Rho GTPase-hippo pathways. Cancer Res. 2018;78:2305-17.
132. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufo S, Haddad D, McVeigh R i sur. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D733-45.
133. Dalgleish R. The human collagen mutation database. Nucleic Acids Res. 1998;26: 253-5.
134. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:16219-24.

135. Kujubu DA, Aboseif SR. An overview of nocturia and the syndrome of nocturnal polyuria in the elderly. Nat Clin Pract Nephrol. 2008;4:426-35.
136. Zuber AM, Centeno G, Pradervand S, Nikolaeva S, Maquelin L, Cardinaux L i sur. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:16523-8.
137. Noh JY, Han DH, Yoon JA, Kim MH, Kim SE, Ko IG i sur. Circadian Rhythms in Urinary Functions: Possible Roles of Circadian Clocks? Int Neurourol J. 2011;15:64-73.
138. Zhu Y, Brown HN, Zhang Y, Stevens RG, Zheng T. Period3 structural variation:a circadian biomarker associated with breast cancer in young women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:268-70.
139. Stevens RG. Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes. Epidemiology. 2005;16:254-8.
140. Yeh KT, Yang MY, Liu TC i sur. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma. J Pathol. 2005;206:111-20.
141. Chen ST, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ, Chang JG. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. Carcinogenesis. 2005;26(7):1241-6.
142. Chen R, Yang K, Zhao NB, Zhao D, Chen D, Zhao CR i sur. Abnormal expression of PER1 circadian-clock gene in oral squamous cell carcinoma. Onco Targets Ther. 2012;5:403-7.
143. Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, Yu A, Koo D, Koeffler HP. The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. Mol Cell. 2006;22:375–82.
144. Krugluger W, Brandstaetter A, Kállay E, Schueller J, Krexner E, Kriwanek S i sur. Regulation of genes of the circadian clock in human colon cancer: reduced period-1 and dihydropyrimidine dehydrogenase transcription correlates in high-grade tumors. Cancer Res. 2007;67:7917–22.
145. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. Hum Mol Gen. 2006.doi:10.1093/hmg/ddl207.
146. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM i sur. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. Science. 2001;291(5506):1040-3.
147. Montagner A, Korecka A, Polizzi A, Lippi Y, Blum Y, Canlet C. Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome-derived signals. Sci Rep. 2016.doi: 10.1038/srep20127.

148. Mukherji A, Kobiita A, Ye T, Chambon P. Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. Cell. 2013;153:812-27.
149. Sakamoto JK, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H i sur. Multitissue circadian expression of rat periodhomolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. J Biol Chem. 1998;273:27039-42.
150. Yin J, Zhang J, Lu Q. The role of basic leucine zipper transcription factor E4BP4 in the immune system and immune-mediated diseases. Clin Immunol. 2017;180:5–10.
151. Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T i sur. NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. J Immunol. 2011;186:4649-55.
152. Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schroder AJ, Canfield SM i sur. IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching, Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:821-6.
153. Björkholm B, Bok CM, Lundin A, Rafter J, Hibberd ML, Pettersson S. Intestinal Microbiota Regulate Xenobiotic Metabolism in the Liver. PLoS One. 2009.doi:10.1371/journal.pone.0006958.
154. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. Nature. 2002;418(6901):935-41.
155. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB i sur. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. Cell. 2000;103 (7):1009–17.
156. Boden MJ, Kennaway DJ. Circadian rhythms and reproduction. Reproduction. 2006; 132(3):379-92.
157. Bunger MK, Walisser JA, Sullivan R, Manley PA, Moran SM, Kalscheur VL i sur. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the Mop3/Bmal-1 locus. Genesis. 2005;41(3):122-32.
158. Pappa KI, Gazouli M, Anastasiou E, Iliodromiti Z, Antsaklis A, Anagnou NP. The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice. 2013;99(2):151–7.
159. Richards J, Diaz AN, Gumz ML. Clock genes in hypertension: novel insights from rodent models. Blood Pressure Monitoring. 2014;19(5):249-54.

160. Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S i sur. Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. Molecular and Cellular Biology. 2010;30(24):5636–48.
161. Yang S, Van Dongen HP, Wang K, Berrettini W, Bućan M. Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. Molecular Psychiatry. 2009;14(2):143-55.
162. Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV i sur. Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:3407-12.
163. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. Cell Metab. 2006;4:25-36.
164. Inukai T, Inaba T, Dang J i sur. TEF, an antiapoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by down-regulating expression of the common beta chain of cytokine receptors. Blood. 2005;105(11):4437-44.
165. Hua P, Liu W, Kuo SH i sur. Association of Tef polymorphism with depression in Parkinson disease. Mov Disord. 2012;27(13):1694-7.
166. Yang J, Wang B, Chen H, Chen X, Li J, Chen Y i sur. Thyrotroph embryonic factor is downregulated in bladder cancer and suppresses proliferation and tumorigenesis via the AKT/FOXOs signalling pathway. Cell Prolif. 2019.doi:10.1111/cpr.12560.
167. Nelson AC i sur. Protein pheromone expression levels predict and respond to the formation of social dominance networks. J Evol Biol. 2015;28(6):1213-24.
168. Chamero P i sur. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. Nature. 2007;450(7171):899–902.
169. Weger BD, Gobet C, Yeung J, Martin E, Jimenez S, Betrisey B. The Mouse Microbiome Is Required for Sex-Specific Diurnal Rhythms of Gene Expression and Metabolism. Cell Metab. 2019;29(2):362-82.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Istražiti postoji li razlika u izražaju gena Lama 1, Tnc, Cldn1, Col2a1, Egfr, Per1, Per2, Per3, Reverbα, Spon2, Tef, Arntl, Mup7 i Nfil3 u mokraćnom mjehuru GF miševa u usporedbi s SPF miševima.

Animalni modeli i metode: Eksperimentalno istraživanje provedeno je u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta u Splitu. Analizirani su mokraćni mjehuri GF (N=12) i SPF (N=12) miševa soja C57BL/6, starih 6 tjedana. Bilo je 12 mužjaka i 12 ženki (polovica mužjaka je bila SPF, a polovica GF statusa, isto vrijedi i za ženke). Iz uzoraka je izolirana RNA, nakon čega je prevedena u cDNA koja je služila kao predložak za qRT-PCR. Dizajnirane su početnice za gene od interesa. Kao standard za genski izražaj korišten je gen za aktin.

Rezultati: U GF miševa značajno je povećan izražaj gena Per1 ($p<0,0005$), Tef ($p<0,0005$), Per2 ($p<0,005$) i Per3 ($p<0,05$) u usporedbi sa SPF miševima. U GF miševa značajno je smanjen izražaj gena Nfil3 ($p<0,0005$), Arntl ($p<0,0005$) i Spon2 ($p<0,005$) u odnosu na SPF miševe. U GF mužjaka statistički je značajno povećan izražaj gena Mup7 ($p<0,05$) u odnosu na SPF mužjake, dok ne postoji statistički značajna razlika između ženki. Izražaj gena Lama1, Tnc, Cldn1, Col2α1, Egfr i Reverbα nije promijenjenu GF miševa u odnosu na SPF miševe.

Zaključak: Mikrobiota mijenja izražaj nekih gena u mokraćnom mjehuru miševa. U odsustvu mikrobiote (u GF miševa) promijenio se izražaj većine gena koji kontroliraju cirkadijani ritam, dok je od svih testiranih gena izvanstanične tvari samo jedan bio promijenjen. Samo kod mužjaka se značajno promijenio izražaj gena Mup7, koji je dio feromonskog sustava miša. Buduće studije trebaju istražiti značaj opisanih promjena.

9. SUMMARY

THE DIFFERENCES IN GENE EXPRESSION IN BLADDER OF MICE BRED IN STERILE AND STANDARD ENVIRONMENT

Objectives: To determine differences in expression of Lama 1, TNC, CLDN1, Col2a1, EGFR, Per1, Per2, Per3, Reverbα, Spon2, Tef, Arntl, Mup7 and Nfil3 genes between bladder tissue of germ-free and specific-pathogen free mice.

Animal models and methods: Experimental research was conducted at Laboratory for cancer research at University of Split School of Medicine. Bladder tissue of 6 weeks old GF (N=12) and SPF (N=12) wild type C57BL/6 mice was analised. There were 6 females and 6 males (half od males was GF and half was SPF, the same is true for females). RNA was isolated from tissue samples and then converted into cDNA by reverse transcription. cDNA was used as a template for qRT-PCR reaction. Primers were designed for genes of interest. Action gene was used as a housekeeping control.

Results: In GF mice gene expression was significantly increased for Per1 ($p<0.0005$), Tef ($p<0.0005$), Per2 ($p<0.005$) and Per3 ($p<0.05$) genes compared to SPF mice. Expression of Mup7gene was significantly increased in GF males ($p<0.05$) compared to SPF males. There was no significant difference in Mup7 expression between females. In GF females and males gene expression was significantly decreased for Nfil3 ($p<0.0005$), Arntl ($p<0.0005$) and Spon2 ($p<0.005$) genes compared to SPF females and males. Expression of genes Lama1, Tnc, Cldn1, Col2α1, Egfr and Reverbα was not changed in GF mice compared to SPF mice.

Conclusion: Microbiota is influencing gene expression in mice urinary bladder. Expression of most of the tested circadian rhytm genes is significantly changed in GF mice. Expression of only one (Spon2) extracellular matrix gene is significantly changed. Expression of Mup7 gene is increased in GF males. Future studies need to address relevance of presented findings.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ana Šimić

Adresa: A.B.Šimića 12, 21204 Dugopolje

Elektronička pošta: simic.ana1107@gmail.com

Državljanstvo: hrvatsko

Datum i mjesto rođenja: 11. srpnja 1994., Split

Obrazovanje:

2001. –2009. Osnovna škola Dugopolje, Dugopolje

2009. –2013. Opća gimnazija Marko Marulić u Splitu

2013. – 2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer Medicina

Strani jezici: engleski jezik (C2), talijanski jezik (A2)

NAGRADE:

Dekanova nagrada 2019. godine

Rektorova nagrada za izvrsnost 2018. godine

Najuspješniji tinejdžer Hrvatske (najviše internet glasova) 2010. godine

STUDENTSKE AKTIVNOSTI:

Organizator sportskog natjecanja **''**Humanijada" 2019.

2. mjesto na Unisport Split 2018., ženski rukomet

Demonstratorica pri katedri za Medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju 2016./2017.

Demonstratorica pri katedri za Anatomiju ak.god. 2014./2015.

Član A studentske sekcije STUZV (2015 – 2017) i organizator dvaju tečaja ultrazvuka "SoundVision" za studente medicine i mlade liječnike 2016. i 2017.godine

Sudjelovanje na skupu predavanja i radionica "Praktična znanja za studente"

Volontiranje i sudjelovanje na 8. Hrvatskom kongresu farmakologije s međunarodnim sudjelovanjem 2016. godine

Volontiranje i sudjelovanje na XXIII Internacionalnom Simpoziumu o Glikokonjugatima (GLYCO 23) 2015. godine

STUDENTSKA PRAKSA:

Odjel za neurokirurgiju Centralne bolnice Sveučilišta u Coimbri, Portugal u rujnu 2018. godine

Ambulanta hitne pomoći u Indersdorfu i Odjel za moždani udar u HELIOS Amper Bolnici u Dachau, Njemačka u rujnu 2017. godine