

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

ILIJA PERUTINA, dr. med.

**POPOREMEĆAJI U IZMJENI IZMEĐU KANONSKOG I NEKANONSKOG WNT
SIGNALNOG PUTA U RAZVOJNIM I POSTNATALNIM ANOMALIJAMA
BUBREGA U ČOVJEKA I MIŠA**

Doktorski rad

Split, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

ILIJA PERUTINA, dr. med.

**POREMEĆAJI U IZMJENI IZMEĐU KANONSKOG I NEKANONSKOG WNT
SIGNALNOG PUTA U RAZVOJNIM I POSTNATALNIM ANOMALIJAMA
BUBREGA U ČOVJEKA I MIŠA**

Doktorski rad

Split, 2025.

Doktorska disertacija je izrađena u sklopu projekata Hrvatske zaklade za znanost: „Karakterizacija kandidat gena za prirođene anomalije bubrega i urotrakta tijekom razvoja u miša i čovjeka” (IP-2016-06-2575) i „Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava (NEPHROGEN)” (IP-2022-10) voditeljice prof. dr. sc. Katarine Vukojević.

Objavljeni znanstveni radovi na kojima se temelji doktorska disertacija

1. **Perutina I**, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Ogorevc M, Filipovic N, Katsuyama Y, Miskovic J, Vukojevic K. Disturbances in Switching between Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Characterize Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*^{-/-} (*yotari*) Mice. Biomedicines. 2023;11(5). Epub 2023/04/26. (1) (čimbenik odjeka 4,757)
2. **Perutina I**, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Rizikalo A, Filipovic N, Kuzmic Prusac I, Bosnjak M, Miskovic J, Kablar B, Ghahramani N, Vukojevic K. Spatiotemporal distribution of Wnt signaling pathway markers in human congenital anomalies of kidney and urinary tract. Acta Histochemica. 2025;127(1). Epub 2025/02/04. (2) (čimbenik odjeka 2,3)

Najdublju zahvalnost dugujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Katarini Vukojević, koja mi je bila puno više od znanstvenog voditelja. Njezina posvećenost, razumijevanje i ljudska toplina učinili su je mojom pravom akademskom majkom. Zahvaljujući njezinoj podršci i povjerenju, s lakoćom sam savladavao i najzahtjevnije dijelove ovog puta.

Zahvaljujem i svom komentoru, prof. dr. sc. Josipu Miškoviću, na stručnim savjetima i podršci koja je značajno doprinijela kvaliteti rada.

Posebnu zahvalnost upućujem dr. sc. Neli Kelam i dr. med. Mirku Maglici, čija su pomoć i poticaj bili ključni u svakom koraku ovog istraživanja. Bez njih ovaj rad ne bi bio moguć.

Neizmjereno sam zahvalan svojoj supruzi Emiliji koja je sa mnom strpljivo prolazila svaki izazov ovog procesa. Bila je moj oslonac kad je bilo najteže – svojim riječima, djelima i tihom upornošću me bodrila, motivirala i vjerovala u mene.

Zahvaljujem Bogu i svojim roditeljima, koji su mi od samih početaka pružali ljubav, sigurnost i vjetar u leđa - temelj su svega što danas jesam.

Sadržaj

POPIS KRATICA I OZNAKA.....	1
1. UVOD	7
1.1. Embrionalne faze nefrogeneze čovjeka i miša	8
1.1.1. Pronefros	8
1.1.2. Mezonefros.....	9
1.1.3. Metanephros	10
1.2. Ključni stanični i molekularni procesi	13
1.3. Osnovni koncepti Wnt signalizacije	13
1.3.1. Kanonski (β -katenin ovisni) put	16
1.3.2. Nekanonski (β -katenin neovisni) put	19
1.3.2.1. Wnt/ Ca^{2+} signalni put.....	19
1.3.2.2. Wnt/PCP signalni put.....	20
1.4. Wnt signalizacija u morfogenezi bubrega	22
1.4.1. Kanonski Wnt put.....	23
1.4.2. Nekanonski Wnt put	24
1.4.3. Međusobne interakcije i izmjene kanonskog i nekanonskog puta	26
1.5. CAKUT i poremećaji Wnt signalizacije.....	27
1.5.1. Hipoplazija	31
1.5.2. Displazija.....	33
1.5.3. Dvostruki ureter.....	34
1.5.4. Potkovičasti bubreg	35
1.6. CAKUT kandidat geni kao medijatori Wnt kanonskog i nekanonskog puta	35
1.6.1. α -tubulin	35
1.6.2. Inversin.....	36
1.6.3. DVL.....	38
1.6.4. Wnt5a/b	39
1.6.5. β -katenin.....	40
1.7. <i>Yotari</i> miševi (<i>Dab1</i> ^{-/-}) kao model za istraživanje Wnt signalizacije u razvoju bubrega	41
1.8. Dijagnostika i liječenje CAKUTa.....	43

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	45
2.1. Ciljevi istraživanja.....	46
2.2. Hipoteze istraživanja	47
3. MATERIJALI I METODE.....	48
3.1. Etička dozvola	49
3.2. Prikupljanje animalnih uzoraka.....	49
3.2.1. Izračun veličine uzorka	50
3.3. Prikupljanje humanih uzoraka	50
3.3.1. Izračun veličine uzorka.....	52
3.4. Histološka analiza.....	52
3.4.1. Priprema bubrežnog tkiva za histološku analizu.....	52
3.4.2. Hematoksilin-eozin bojanje.....	52
3.4.3. Imunofluorescentno bojanje	53
3.5. Prikupljanje podataka i obrada mikrofotografija.....	54
3.6. Statistički postupci.....	55
4. REZULTATI.....	57
4.1. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β - katenin proteina u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	58
4.1.1. Imunoekspresija acetiliranog α -tubulina	59
4.1.2. Dvostruko imunofluorescentno bojenje inversina i DVL-1 u razvojnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i>	62
4.1.2.1. Ekspresija inversina i DVL-1 u razvojnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i>	62
4.1.2.2. Ekspresija inversina i DVL-1 u postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i>	64
4.1.3. Dvostruko imunofluorescentno bojenje Wnt5a/b i β -katenina u razvojnim i postnatalnim.....	66
4.1.3.1. Ekspresija Wnt5a/b i β -katenina u razvojnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i>	66

4.1.3.2. Izraženost Wnt5a/b i β -katenina u postnatalnom bubregu miševa divljeg tipa i <i>yotari</i>	69
4.2. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja α -tubulin, inversin, DVL-1 i β -katenin proteina u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima urođenim anomalijama bubrega i urotrakta.....	72
4.2.1. Imunoekspresija acetil- α -tubulina	72
4.2.2. Dvostruko imunofluorescentno bojenje za inversin i DVL-1	75
4.2.3. Imunoekspresija β -katenina.....	78
5. RASPRAVA	82
5.1. Izražaj acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	83
5.2. Izražaj acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina u zdravim fetalnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim CAKUT-om	87
6. ZAKLJUČAK	92
7. SAŽETAK.....	95
8. LAIČKI SAŽETAK	98
9. SUMMARY	100
10. LAY SUMMARY	103
11. LITERATURA.....	105
12. KRATKI ŽIVOTOPIS	124

POPIS OZNAKA I KRATICA

A	ampula (<i>eng.</i> ampulla)
ACE	angiotenzin konvertirajući enzim (<i>eng.</i> angiotensin-converting enzyme)
ANOVA	analiza varijance (<i>eng.</i> analysis of variance)
AP	anteroposteriorna os
APC	adenomatozni polipoza kolon protein (<i>eng.</i> adenomatous polyposis coli)
Arm	Armadillo
BMP4	koštani morfogenetski protein 4 (<i>eng.</i> bone morphogenetic protein 4)
bv	krvne žile (<i>eng.</i> blood vessels)
Ca ²⁺	ioni kalcija
CAKUT	prirođene anomalije bubrega i urotrakta (<i>eng.</i> congenital anomalies of the kidney and urinary tract)
CaMKII	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (<i>eng.</i> Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II)
Cd	sabirni kanalić (<i>eng.</i> collecting duct)
Cdc	ciklus stanične diobe (<i>eng.</i> cell division cycle)
CDX2	kaudalno povezani transkripcijski faktor (<i>eng.</i> caudal-related homoeobox transcription factor 2)
CK1	kazein kinaza 1 (<i>eng.</i> casein kinase 1)
CKD	kronična bubrežna bolest (<i>eng.</i> chronic kidney disease)
CRD	cistein bogata domena (<i>eng.</i> cysteine rich domain)
Cre	Cre rekombinaza
CREB	ciklički AMP odgovorni element vezujući protein (<i>eng.</i> cyclic AMP response element-binding protein)
Ct	zavijeni kanalić (<i>eng.</i> convoluted tubule)

CTRL	zdrava kontrola (<i>eng.</i> control kidneys)
Daam1	Dishevelled-om povezani aktivator morfogeneze 1 (<i>eng.</i> Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1)
<i>Dab1/Dab1</i>	Disabled 1 (mišji gen/protein)
<i>DAB1/DAB1</i>	Disabled 1 (ljudski gen/protein)
DAG	diacilglicerol (<i>eng.</i> diacylglycerol)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>eng.</i> 4',6-diamidino-2-phenylindole)
dct	distalni zavijeni kanalić (<i>eng.</i> distal convoluted tubule)
DEP	Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin protein
dg	displastični glomerul (<i>eng.</i> dysplastic glomerulus)
DIX	Dishevelled and axin protein
Dkk	Dickkopf proteini
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (<i>eng.</i> deoxyribonucleic acid)
dt	displastični tubuli (<i>eng.</i> dysplastic tubules)
DVL	Dishevelled
dw	razvojni tjedan (<i>eng.</i> developmental week)
DYS	displastični bubrezi (<i>eng.</i> dysplastic kidneys)
E	embrionalni dan (<i>eng.</i> embryonic day)
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija (<i>eng.</i> epithelial-mesenchymal transition)
ER	endoplazmatski retikulum (<i>eng.</i> <u>endoplasmic reticulum</u>)
FGF	fibroblastni čimbenik rasta (<i>eng.</i> fibroblast growth factor)
Fz	Frizzled receptor
G	glomerul (<i>eng.</i> glomerulus)
g	nezreli glomerul (<i>eng.</i> immature glomeruli)
GA	Golgijev aparat (<i>eng.</i> Golgi apparatus)

Gata3	Gvanin-adenin-timin-adenin 3 vezujući protein
GDNF	neurotrofni čimbenik glije (<i>eng.</i> glial derived neurotrophic factor)
GSK-3 β	glikogenska sintaza kinaza-3 β (<i>eng.</i> glycogen synthase kinase-3 β)
GTPaza	gvanozin trifosfataza (<i>eng.</i> guanosine-triphosphatase)
H	humani/ljudski
HE	hematoksilin-eozin bojanje (<i>eng.</i> hematoxylin and eosin staining)
HK	potkovičasti bubreg (<i>eng.</i> horseshoe kidney)
HYP	hipoplastični bubreg (<i>eng.</i> hypoplastic kidney)
Ift20	Intraflagelarni transport protein 20 (<i>eng.</i> Intraflagellar transport protein 20)
IM	intermedijarni mezoderm
<i>Int-1</i>	<i>eng.</i> Integration-1
Inv	inversin
IP3	inozitol 1,4,5-trifosfat (<i>eng.</i> inositol 1,4,5-trisphosphate)
IRI	ishemijsko-reperfuzijska ozljeda
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza (<i>eng.</i> c-Jun N-terminal kinase)
kDa	kiloDalton
L	lumbalni/slabinski kralježak
LDL	lipoprotein niske gustoće (<i>eng.</i> low density lipoprotein)
Lef	limfoidni pojačivač (<i>eng.</i> lymphoid enhancer factor)
LRP5/6	LDL receptor-povezani proteinski 5/6 ko-receptor (<i>eng.</i> low density lipoprotein receptor-related protein 5/6)
MET	mezenhimalno-epitelna tranzicija (<i>eng.</i> mesenchymal-epithelial transition)
MM	metanefrički mezenhim (<i>eng.</i> metanephric mesenchyme)
NES	signal za nuklearni izvoz (<i>eng.</i> nuclear export signal)
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih T-stanica (<i>eng.</i> nuclear factor of activated T cells)

NFκB	nuklearni faktor kappa B (<i>eng.</i> nuclear factor-kappa B)
NGS	masivno paralelno sekvenciranje (<i>eng.</i> next-generation sequencing)
NLK	nemo slična kinaza (<i>eng.</i> nemo-like kinase)
NLS	signal za usmjeravanje u jezgru (<i>eng.</i> nuclear localization signal)
P	postnatalni dan (<i>eng.</i> postnatal day)
PAP	peroksidaza-antiperoksidaza (<i>eng.</i> peroxidase-antiperoxidase)
PAX2	upareni gen 2 (<i>eng.</i> paired box gene 2)
PBS	fiziološka otopina puferirana s fosfatom (<i>eng.</i> phosphate-buffered saline)
PCP	planarna stanična polarnost (<i>eng.</i> planar cell polarity)
pct	proksimalni zavijeni kanalić (<i>eng.</i> proximal convoluted tubule)
PDZ	<i>eng.</i> post synaptic density-95/Discs large/Zonula-occludens-1 protein
PFA	paraformaldehid (<i>eng.</i> paraformaldehyde)
PGK	fosfoglicerat-kinaza-1 promotor (<i>eng.</i> phosphoglycerate kinase 1)
PIP2	fosfatidil-inozitol 4,5-bisfosfat (<i>eng.</i> phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PKC	protein kinaza C (<i>eng.</i> protein kinase 2)
PKD	policistična bolest bubrega (<i>eng.</i> polycystic kidney disease)
PLC	fosfolipaza C (<i>eng.</i> phospholipase C)
PORCN	porcupine enzim
PP2A	protein fosfataza 2A (<i>eng.</i> protein phosphatase 2A)
PTK7	protein tirozin kinaza 7 (<i>eng.</i> proteine tyrosine kinase 7)
PUV	stražnji uretralni zalistak (<i>eng.</i> posterior urethral valve)
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (<i>eng.</i> Real-Time Quantitative Reverse Transcription, PCR)
RET	receptor tirozin kinaza (<i>eng.</i> receptor tirosin kinase)
RNA	ribonukleinska kiselina (<i>eng.</i> ribonucleic acid)

ROCK	Rho ovisna protein kinaza (<i>eng.</i> Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase)
Ror	receptorskoj tirozinskoj kinazi slični orfan receptor (<i>eng.</i> Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor)
Rspo	R-Spondine
RUNX2	Runt povezani transkripcijski faktor 2 (<i>eng.</i> Runt-related transcription factor 2)
Rv	bubrežni mjehurić (<i>eng.</i> Renal vesicle)
RYK	receptor povezan s tirozin kinazom (<i>eng.</i> receptor related to tyrosine kinase)
SCF	Skp1/Cullin/F-box protein
Ser	serin
SH2	Src homologna domena 2 (<i>eng.</i> Src homology domain 2)
Six2	<i>eng.</i> Sine oculis homeobox homolog 2 transkripcijski faktor
sur.	suradnici
SŽS	središnji živčani sustav (<i>eng.</i> central nervous system)
TAK1	TGF- β -aktivirane kinaze 1 (<i>eng.</i> TGF- β -activated kinase 1)
TCF	T stanični faktor (<i>eng.</i> T-cell factor)
Thr	treonin
TLE1	transducinu slični pojačivač 1 (<i>eng.</i> transducin-like enhancer 1)
UB	mokraćovodni/ureterični pupoljak (<i>eng.</i> ureteric bud)
UD	dvostruki ureter (<i>eng.</i> duplex urether)
Vangl	Van Gogh-nalik protein (<i>eng.</i> Van Gogh-like protein)
VEGF2	vaskularni endotelni čimbenik rasta 2 (<i>eng.</i> vascular endothelial growth factor 2)
VUR	vezikoureteralni refluks (<i>eng.</i> vesicoureteric reflux)
WES	sekvenciranje čitavog egzoma (<i>eng.</i> Whole Exome Sequencing)

<i>Wg</i>	<i>eng.</i> Wingless
Wls	<i>eng.</i> Wntless protein
Wnt	<i>eng.</i> wingless-type integration site family (Wingless + Int-1)
WRE	Wnt odgovarajući elementi (<i>eng.</i> Wnt-responsivne elements)
WRK	Wnt5a-ROR-Kif26b test
wt	divlji tip (<i>eng.</i> wild type)
<i>yot</i>	<i>yotari</i>
β -TrCP	<i>eng.</i> β -transducin repeat containing protein

1. UVOD

U uvodnom dijelu disertacije prikazat će se osnovni razvojni procesi formiranja bubrega, s naglaskom na embrionalne faze nefrogeneze kod čovjeka i miša. Bit će objašnjeni stanični i molekularni mehanizmi koji upravljaju organogeneom bubrega, pri čemu će se posebna pažnja posvetiti Wnt signalnom putu kao ključnom regulatoru. Opisat će se osnovne značajke kanonske i nekanonske Wnt signalizacije, njihove međusobne interakcije te specifične uloge u morfogenezi bubrega. Potom slijedi pregled prirođenih anomalija bubrega i urotrakta (CAKUT), uključujući hipoplaziju, displaziju, dvostruki ureter i potkovičasti bubreg, uz naglasak na njihovu povezanost s poremećajima Wnt signalizacije. Nadalje, bit će analizirani CAKUT kandidat geni koji djeluju kao medijatori Wnt signalnog puta. U kontekstu istraživačkog dijela rada, predstaviti će se *yotari* miš (*Dab1*^{-/-}) kao genetski model za proučavanje poremećaja u signalizaciji tijekom razvoja bubrega. U završnom dijelu uvoda bit će sažeto prikazane suvremene dijagnostičke metode i terapijski pristupi u liječenju CAKUT-a.

1.1. Embrionalne faze nefrogeneze čovjeka i miša

Razvoj bubrega u ljudi i miševa odvija se kroz niz precizno koordiniranih faza koje uključuju kompleksne stanične i molekularne interakcije. Kod ljudi, nefrogeneza započinje oko četvrtog tjedna gestacije i završava od 34. do 37. tjedna trudnoće, dok kod miševa, čija gestacija traje oko 20 dana, završava nekoliko dana nakon rođenja (3, 4). Tijekom embriogeneze, nefroni se formiraju kroz niz ponavljajućih induktivnih interakcija između ureteričkog pupoljka (UB) i metanefričkog mezenhima (MM). Odrasli bubreg sisavaca nastaje iz intermedijarnog mezoderma (IM) kao metanefros, završna faza razvoja nakon pronefrosa i mezonefrosa, koji se formiraju kontinuirano duž kraniokaudalne embrionalne osi (5). Razvoj bubrega kod ljudi i miševa temelji se na sličnim signalnim putovima i transkripcijskim faktorima, ali se vremenski razlikuje u obrascima pojave prijelaznih oblika zbog različite duljine trajanja gestacije čovjeka i miša (6).

1.1.1. Pronefros

Pronefros (predbubreg), kao prvi i najprimitivniji stadij, obilježava početak nefrogeneze i razvoj ekskretornog sustava (7). Iako kod sisavaca nema značajnu funkcionalnu ulogu, pronefros je ključan za inicijalne procese indukcije i diferencijacije bubrežnog tkiva (8). Za razliku od mezonefrosa i metanefrosa, pronefros se sastoji isključivo od neintegriranih nefrona s vanjskim glomerulima.

Pojavljuje se otprilike u 22. embrionalnom danu (E22) kod ljudi (H), 11. kod štakora (E11) i 8. kod miša (E8) (Slika 1) (9, 10). Pronefrički kanalići nastaju u kranijalnom dijelu nefrogenog tračka, šire se i spajaju s kloakom, dok se obližnji intermedijarni mezoderm kondenzira u pronefroze - nefunkcionalne nefrogene jedinice građene od nefrotoma i nefrocela, koje regrediraju do 25. dana u čovjeka i 9. dana u miša (11, 12). Iako pronefros nema funkciju, njegova važnost leži u tome što se tijekom njegove regresije stražnji dio pronefričkog kanalića zadržava i postupno razvija u Wolffov nefrički kanal, koji potom ima ključnu ulogu u poticanju razvoja mezonefrosa (13).

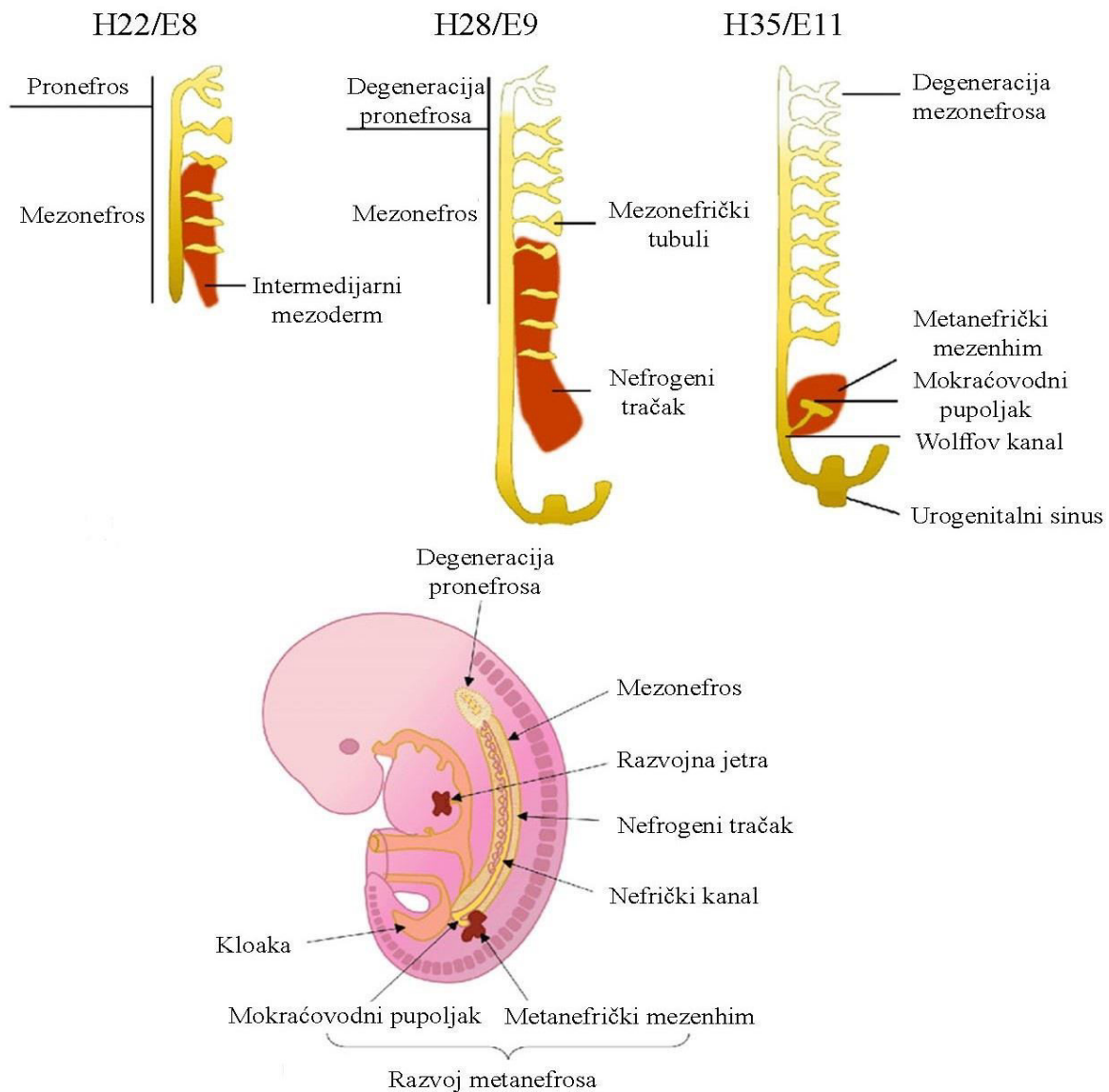
Zbog svoje prolazne prirode, pronefros kod sisavaca ne pokazuje razvijene filtracijske kapacitete kao kod riba i vodozemaca. U zebri, pronefros ostaje aktivan i sudjeluje u regulaciji ravnoteže tekućina i iona tijekom rane ontogeneze (14). Njegova funkcionalna ograničenja kod sisavaca nadoknađuju se ubrzanim razvojem mezonefrosa i metanefrosa, dok kod vodozemaca pronefros ima ulogu primarnog bubrega sve do razvoja mezonefrosa (7, 14).

1.1.2. Mezonefros

Mezonefros predstavlja drugu fazu razvoja embrionalnog bubrega te se sastoji od Wolffovog kanala i jednostavnih mezonefričkih nefrona koji se počinju razvijati tijekom 4. gestacijskog tjedna kod čovjeka, E9 kod miša (11, 15, 16). Njegov razvoj započinje u najkaudalnijem dijelu nefrogenog tračka iako se ranije smatralo da se kranijalni nefroni mogu izravno razviti iz nefričkog kanala, suvremena istraživanja ukazuju na to da kanal doprinosi isključivo stvaranju kratkog spojnog segmenta (16). Iako se kod čovjeka formira do četrdesetak parova mezonefričkih jedinica, samo oni smješteni u razini L1 do L3 nastavljaju diferencijaciju u funkcionalne ekskretorne strukture. Između šestog i desetog tjedna gestacije razvija se oko dvadesetak nefrona sposobnih za ograničeno izlučivanje urina u amnionsku šupljinu. Mezonefros i njegov kanal u ženskom se embriju postupno povlače i degeneriraju, dok se u muškaraca dijelovi tih struktura održavaju i dalje diferenciraju u elemente reproduktivnog sustava: epididimis, sjemenovod, sjemene mjehuriće i ejakulacijski kanal. Istodobno, Wolffov kanal se izdužuje kaudalno i spaja s urogenitalnim sinusom, iz kojeg se kasnije razvija mokraćni mjehur. Tijekom ovog razvojnog stadija, izbočenje iz Wolffovog kanala formira ureterični (mokraćovodni) pupoljak, ključan za nastanak trajnog bubrega (Slika 1) (12).

Kod miša, većinu mezonefrosa čine kaudalni, primitivni kanalići koji nastaju iz stanica nefrogene vrpce u području somita 8-9, pri čemu te stanice prolaze mezenhimalno-epitelnu tranziciju (MET), stvarajući prvo renalne mjehuriće, a zatim S-oblikovana tijela. Mezonefros

miša se sastoji od otprilike 18 parova tubula smještenih između 10. i 17. somita, koji se jasno dijele na kranijalne i kaudalne skupine (16). Regresija mezonefroza kod miša započinje oko embrionalnog dana E14, s brzim nestankom većine tubula apoptozom, i to u smjeru od kranijalnog prema kaudalnom dijelu, dok kod čovjeka taj proces započinje krajem trećeg mjeseca trudnoće (10, 17, 18).



Slika 1. Razvojni stadiji ljudskog bubrega. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci Kakun i sur., 2022, pod licencom *CC BY 4.0* (10)).

1.1.3. Metanephros

Razvoj metanefričkog bubrega započinje odvajanjem mokraćovodnog pupoljka od

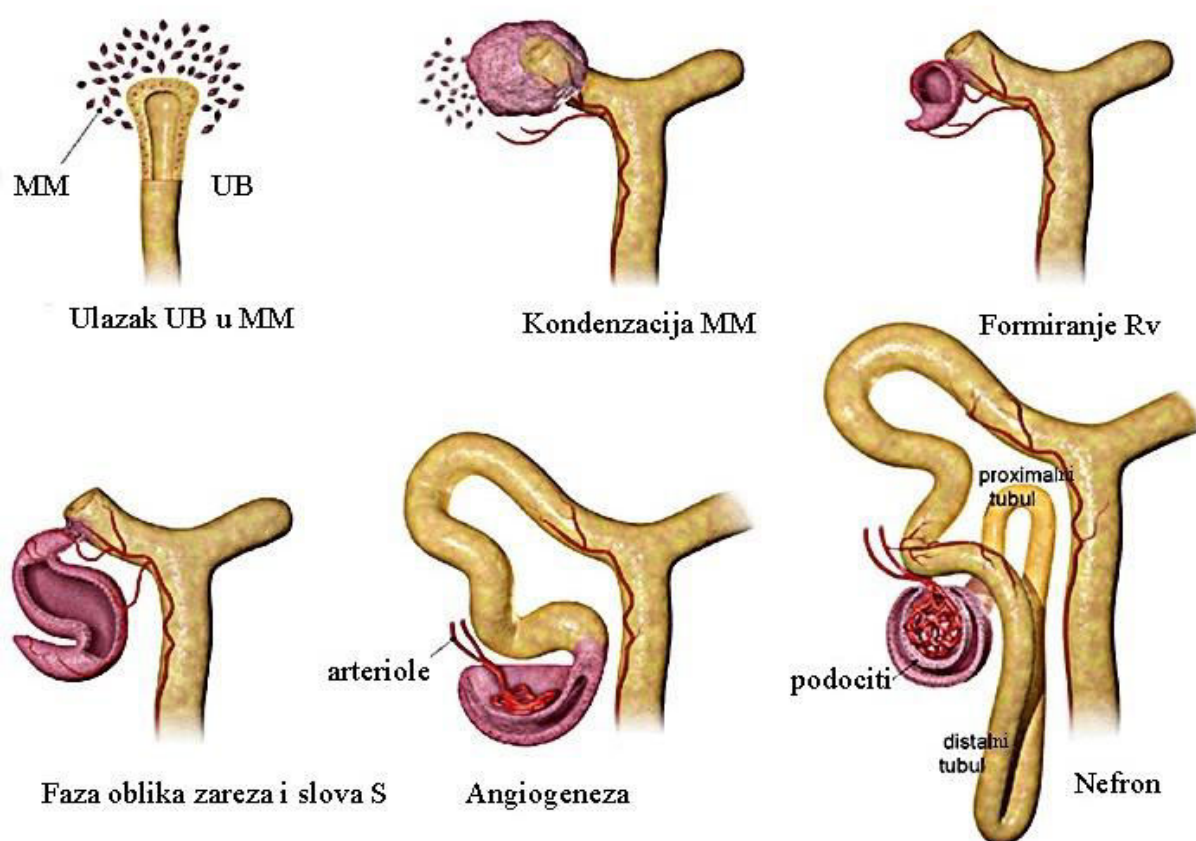
mezonefričkog kanala u 4.-5. gestacijskom tjednu kod čovjeka, E11 kod miša, prodirući u metanefrički mezenhim i prolazi kroz granulaciju morfogeneze (19). U šestom tjednu razvoja, UB počinje grananje, što dovodi do formiranja sabirnog sustava bubrega - od bubrežne zdjelice, preko vrčeva do sabirnih kanalića. Istodobno, MM također prolazi kroz morfogenezu putem mezenhimalno-epitelne tranzicije formirajući tijelo u obliku zareza koje se dalje proteže u tijelo u obliku slova S (Slika 2). Interakcije između metanefričkog mezenhima i vrha ureteričnog pupoljka dovode do uspostave složenih epitelno-mezenhimskih signalnih puteva. Ove interakcije pokreću dvosmjernu komunikaciju: neurotrofni čimbenik glijе (GDNF), kojeg izlučuje metanefrički mezenhim, potiče grananje UB putem receptora RET, a taj proces je nužan za formiranje bubrežnog sabirnog sustava i indukciju stvaranja nefrona (20). U isto vrijeme, ureterični pupoljak luči signalne molekule koje potiču aktivaciju transkripcijskih čimbenika PAX2 i Wnt4 u metanefričkom mezenhimu, čime započinje proces mezenhimalno-epitelne tranzicije. Tijekom tog prijelaza, stanice mezenhima počinju izražavati adhezijske molekule poput sindekana i E-kadherina, što omogućuje formiranje bubrežnih mjehurića - početnih struktura nefrona (12, 18, 21). Potom se mjehurići dalje razvijaju u strukture u obliku zareza i slova S, iz kojih nastaju različiti dijelovi nefrona: iz proksimalnog dijela formira se distalni kanalić, iz sredine proksimalni kanalić i Henleova petlja, a iz distalnog dijela Bowmanova čahura (22, 23). U Bowmanovoj čahuri, visceralne stanice postaju podociti, a parijetalne epitelne stanice parijetalni list čahure.

Glomerulogeneza uključuje urastanje kapilara i mezangijskih stanica između 8. i 10. razvojnog tjedna kod čovjeka, E13 kod miša, te stvaranje glomerularne bazalne membrane i povezivanje nefrona sa sabirnim sustavom koji se razvija iz ureteričnog pupoljka. Razvoj glomerula započinje kada prekursori podocita u S-oblikovanom tijelu luče VEGF2, privlačeći endotelne stanice i stvarajući primitivni vaskularni snopić (24). Time nastaju aferentna i eferentna arteriola. Kontakt podocita i endotela potiče njihovu diferencijaciju te nastaje glomerularna bazalna membrana. Nefrogeneza uključuje usklađeni razvoj krvnih žila, pri čemu se kapilare povezuju s arterijskim sustavom putem aferentnih arteriola, omogućujući protok krvi kroz glomerule i početak filtracije. Aferentne arteriole ulaze u glomerule a nastaju iz bubrežne arterije, koja je grana dorzalne aorte.

Fibroblastni čimbenici rasta (FGF) igraju ključnu ulogu u regulaciji grananja ureteričnog pupoljka i diferencijacije metanefričkog mezenhima. Istraživanja su pokazala da primjena egzogenih FGF-ova potiče rast i sazrijevanje tih struktura, dok su transgenični miševi s pojačanom ekspresijom dominantno negativnog oblika FGF receptora razvili bubrežnu

aplaziju ili izražene displastične promjene (25). β -katenin i Gata3 reguliraju ekspresiju RET-a i sprječavaju preranu diferencijaciju epitela Wolffova kanala, omogućujući pravilno formiranje UB-a (26, 27). Osim toga, proteini poput Sprouty1 i BMP4 ograničavaju aktivaciju RET-a i sprječavaju nastanak višestrukih pupoljaka, dok Gremlin1, inhibitor BMP4, omogućuje normalno grananje UB-a (28). Ukupno gledano, ravnoteža između promotora i inhibitora RET signalizacije presudna je za ispravno mjesto i dinamiku ureteričnog pupanja te razvoj funkcionalnog bubrega.

U zaključku, ureterični pupoljak predstavlja temelj za formiranje sustava sabirnih kanala, uključujući ureter, bubrežnu zdjelice, vrčeve te sabirne kanale i kanaliće, dok se metanefrogeni mezoderm diferencira u glomerule, tubularne dijelove nefrona i bubrežni intersticij (stromu). Poremećaji u razvoju metanefričkog bubrega dovode do razvoja prirodnih anomalija bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT), dok broj nefrona uglavnom ovisi o broju ogranaka nastalih tijekom razvoja metanefričkog bubrega, pa poremećaji u tom procesu mogu povećati rizik od razvoja kronične bubrežne bolesti u kasnijem životu.



Slika 2. Grananje mokraćovodnog pupoljka i razvoj nefrona. (Preuzeto i prilagođeno prema referenci Seely JC, 2017, pod licencom CC BY-NC 4.0 (13)).

1.2. Ključni stanični i molekularni procesi

Razvoj bubrega je visoko koordiniran proces koji uključuje složene međustanične interakcije i preciznu aktivaciju različitih signalnih mreža. Među njima, Wnt signalni put zauzima središnje mjesto, budući da regulira proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i apoptozu stanica tijekom nefrogeneze. Neravnoteža u ovom putu može dovesti do kongenitalnih anomalija bubrega i urotrakta, uključujući pojave poput dvostrukog uretera ili hipoplazije bubrega. U ovoj disertaciji poseban će se naglasak staviti na ulogu Wnt signalizacije u razvoju bubrega, uzimajući u obzir i njezinu povezanost s signalnim putem DAB1, posebno u kontekstu poremećaja koji se javljaju kod mišjeg modela *yotari*, koji nosi mutaciju u genu za *Dab1*.

Intracelularni adapter protein Disabled 1 (DAB1) igra ključnu ulogu tijekom embriogeneze bubrega. Dokazano je kako kanonski signalni put reelin/DAB1 sudjeluje u regulaciji stanične diferencijacije. Aktivacija ovog puta započinje vezanjem reelin proteina na odgovarajuće receptore, što rezultira tirozin-fosforilacijom DAB1 proteina. Fosforilirani DAB1 zatim djeluje kao platforma za regrutaciju i aktivaciju različitih signalnih molekula, uključujući one uključene u Wnt signalni put, zahvaljujući interakciji s proteinima koji posjeduju SH2 domene (29), te na taj način regulira proliferaciju, migraciju, diferencijaciju bubrežnih stanica tijekom embriogeneze.

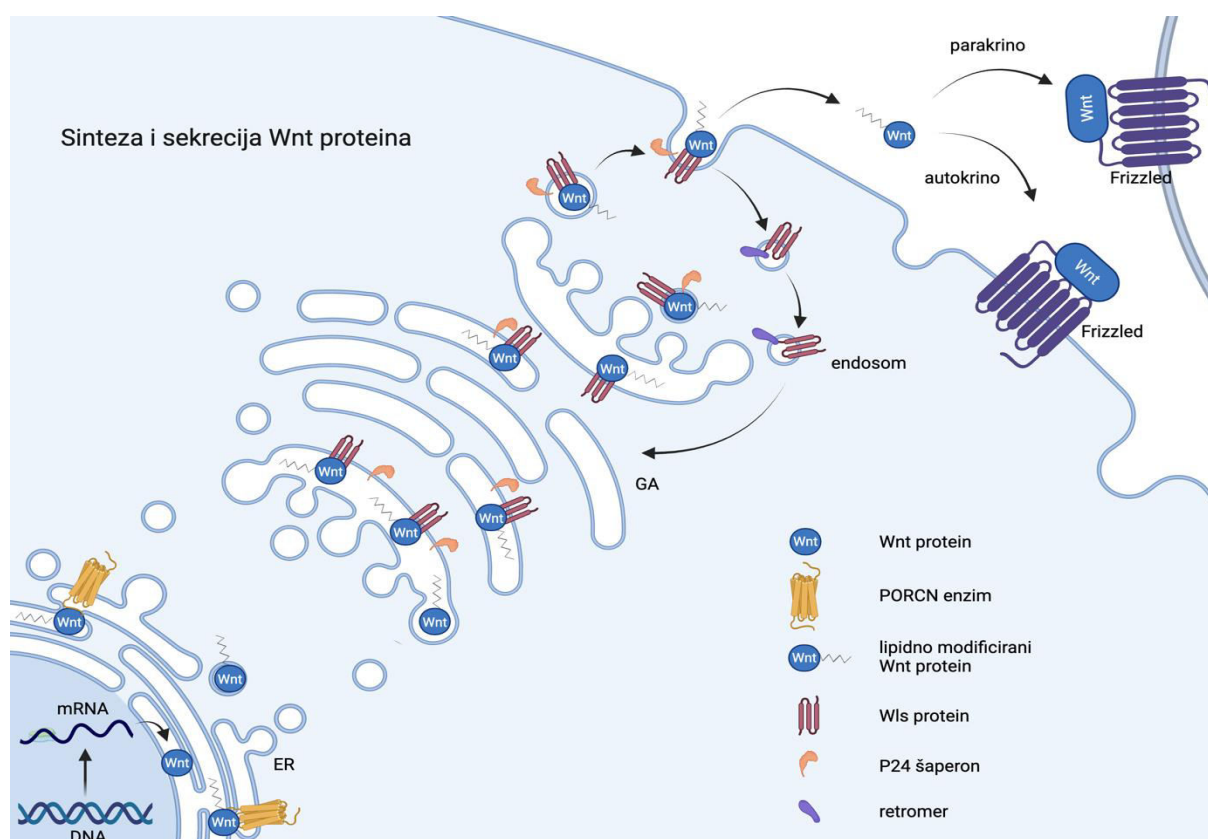
1.3. Osnovni koncepti Wnt signalizacije

Wnt signalni put je evolucijski vrlo konzerviran i ključan za pravilno odvijanje brojnih razvojnih procesa kod svih višestaničnih organizama. Porijeklo riječi se sastoji od riječi Wg - wingless, gen prvi put otkriven kod voćne mušice (*Drosophila melanogaster*), te Int koja dolazi od riječi „Integration”, odnosno *Int-1*, protoonkogen otkrivenog kod miša u kontekstu virusom induciranog raka dojke (30). Wnt signalni put je uključen u regulaciju stanične proliferacije, polarizacije, migracije, diferencijacije i apoptoze, što ga čini centralnim mehanizmom u embriogenezi i organogenezi. Tijekom embriogeneze predstavlja most između staničnih signala i genetskog odgovora koji vodi formiranju kompleksnog organizma. Wnt signalizacija igra ključnu ulogu u formiranju tjelesnih osi, uključujući anteroposteriornu (AP) i dorzoventralnu os, te u razvoju različitih organa poput srca, pluća, bubrega i živčanog sustava (31). Detaljno razumijevanje Wnt signalizacije omogućuje bolji uvid u uzroke razvojnih poremećaja (srčane malformacije, CAKUT, policističnu bolest bubrega, kongenitalne defekte neuralne cijevi, karcinom debelog crijeva, hepatocelularni karcinom itd.) ali i razvoj ciljanih

terapija za brojne bolesti.

Wnt geni kodiraju 19 evolucijski očuvanih glikoproteina, koji sadrže 350-400 aminokiselina te 22-24 ostatka cisteina (32). U endoplazmatskom retikulumu (ER), ti se Wnt ligandi nakon translacije kemijski modificiraju pomoću enzima PORCN, koji pripada obitelji O-acil transferaza (33). Ova modifikacija uključuje acetilaciju, koja potom omogućuje dodavanje masne kiseline, odnosno palmitoilaciju (34). Nakon lipidne modifikacije, Wnt proteine prepoznaje i veže Wntless (Wls), transmembranski protein s višestrukim membranskim umreženjem, koji ih transportira iz ER-a do Golgijevog aparata (GA) u vezikulama uz pomoć P24 proteina kao šaperona, te ih potom usmjerava prema plazmatskoj membrani putem sekretornog puta (Slika 3) (35). Nakon što se Wnt protein oslobodi iz stanice, Wls se reciklira putem endosom i retromer kompleksa natrag u Golgi, gdje ponovno djeluje kao pratitelj za transport novoprocisiranog Wnt proteina do stanične površine.

Wnt kao lipidno modificirani glikoproteini mase oko 40 kDa, se ponašaju kao morfogeni - molekule koje u embriogenezi reguliraju aktivaciju Wnt puta parakrino ili autokrino putem vezanja na receptore na membrani ciljne stanice tako aktivirajući različite signalne kaskade.



Slika 3. Proces sinteze i sekrecije Wnt proteina. (Uređeno i prilagođeno pomoću BioRender.com aplikacije, pod licencom BioRender Academic License).

Wnt signalni put ima ključnu i višestruku ulogu u regulaciji embriogeneze, sudjelujući u oblikovanju tijela, određivanju staničnih sudbina i razvoju brojnih organskih sustava. Tijekom rane embrionalne organizacije, primjerice, Wnt3 je neophodan za formiranje primitivne pruge, čime se uspostavlja AP os i započinje diferencijacija zametnih slojeva ektoderma, mezoderma i endoderma (36).

U razvoju živčanog sustava, Wnt signalizacija regulira proliferaciju neuralnih progenitora te, u ravnoteži s BMP signalizacijom, utječe na indukciju stanica neuralnog grebena i oblikovanje različitih moždanih regija. U oblikovanju neuralne ploče se posebno ističe Wnt signalizacija, čiji se učinci na određivanje neuralnih sudbina duž AP osi mogu mijenjati ovisno o koncentraciji (37). Wnt signalizacija također ima važnu ulogu u formiranju neuronskih krugova, razvoju dendrita i aksona, formiranju dendritskih izdanaka te u sinaptogenezi. Na taj način sudjeluju u regulaciji proliferacije, izlaska stanica iz staničnog ciklusa i neurogeneze u razvoju ventrikularne zone neokorteksa. Prekomjerna ekspresija dominantno aktivnog oblika β -katenina u ventrikularnoj zoni pomoću nestin promotora dovela je do poremećaja u kontroli proliferacije neuralnih prekursora kore mozga kod miševa (38). U malom mozgu i leđnoj moždini, prisutnost Wnt7a i Wnt3 potiče rast i grananje aksona povećanjem veličine i složenosti rasta neurita te povećanjem promjera aksona. Wnt proteini, osobito interakcija Wnt4 i receptora Frizzled3 (Fz3), imaju ključnu ulogu u usmjeravanju komisuralnih aksona u leđnoj moždini nakon prelaska srednje linije, potičući njihovo anteriorno usmjerenje. U miševa s mutacijom Fz3, aksoni se nakon prelaska srednje linije projiciraju nasumično, uz poremećaje u razvoju više aksonskih puteva poput kortikotalamičkih, talamokortikalnih i nigrostriatalnih (39, 40). Stoga, poremećaji Wnt signalizacije povezani su s brojnim bolestima središnjeg živčanog sustava (SŽS) kao što su razvojni poremećaji (liscencefalija i mikrocefalija), maligni tumori dječje dobi (meduloblastomi), neurodegenerativne bolesti itd.

U razvoju koštanog sustava, Wnt proteini, poput Wnt5a i Wnt7a, ključni su za regulaciju polarizacije i rasta tkiva unutar pupoljaka ekstremiteta, što omogućava pravilno oblikovanje kostiju i zglobova. Također, Wnt β -katenin signalni put ima važnu ulogu u određivanju sudbine stanica, poput hondrocita i osteoblasta, tijekom diferencijacije osteohondralnih progenitorskih stanica (41). Ovaj put regulira uzastopne cikluse proliferacije i hipertrofije hondrocita u hrskavici dugih kostiju, što je ključno za njihov rast, kao i indukciju formiranja sinovijalnih zglobova. Kada je Wnt signalizacija aktivirana, β -katenin pokreće ekspresiju transkripcijskih faktora kao što su RUNX2 i Osterix, koji su odgovorni za

osteogenezu (42). Ovi faktori igraju ključnu ulogu u prepoznavanju prekursorskih stanica koje će se diferencirati u osteoblaste, stanice koje formiraju koštanu masu. Na primjer, homozigotna mutacija Wnt3a, proteina kanonskog Wnt signalnog puta, može izazvati ozbiljne deformacije i abnormalnosti u razvoju kostiju, npr. tetraameliju, što predstavlja potpuni nedostatak razvoja ekstremiteta (43).

Osim toga, Wnt signalizacija sudjeluje i u razvoju srca (npr. Wnt11), pluća (kontrola grananja), crijeva (regulacija proliferacije matičnih stanica), te kože i folikula dlake, gdje doprinosi odabiru stanične sudbine i modeliranju tkiva. Kroz sve ove procese, Wnt signalizacija se pokazuje kao središnji regulator embriolonalnog razvoja, čija precizna aktivacija i inhibicija omogućuju pravilnu organizaciju tijela i funkcionalnost organa.

Ovisno o tome aktivira li se intracelularni protein β -katenin, razlikujemo:

1. Kanonski Wnt (β -katenin ovisni) signalni put:

- Aktivira se kada Wnt ligandi (npr. Wnt1, Wnt3a, Wnt8) vežu receptor Frizzled i LDL receptor - povezane proteinske 5/6 ko-receptore (LRP5/6) koji u konačnici ima cilj nakupljanja β -katenina u jezgri i poticanja transkripcije i ekspresije ciljanih gena.

2. Nekanonski Wnt (β -katenin neovisni) signalni put:

- Wnt/ Ca^{2+} put - utječe na stanični odgovor unutarnjih signalnih molekula putem Fz i G-protein povezanih receptora, te aktivira Ca^{2+} signalizaciju, a zatim pokreće kinaze kao što su protein kinaza C (PKC) i kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II (CaMKII).
- Wnt/PCP put (put planarne stanične polarnosti) - aktivira se kada Wnt ligandi (npr. Wnt5a, Wnt6, Wnt7a, Wnt11, Wnt15) vežu Ror i Fz receptore, koji aktiviraju GTPaze poput Rho i Rac, što dovodi do promjena u citoskeletu i organizaciji stanica.

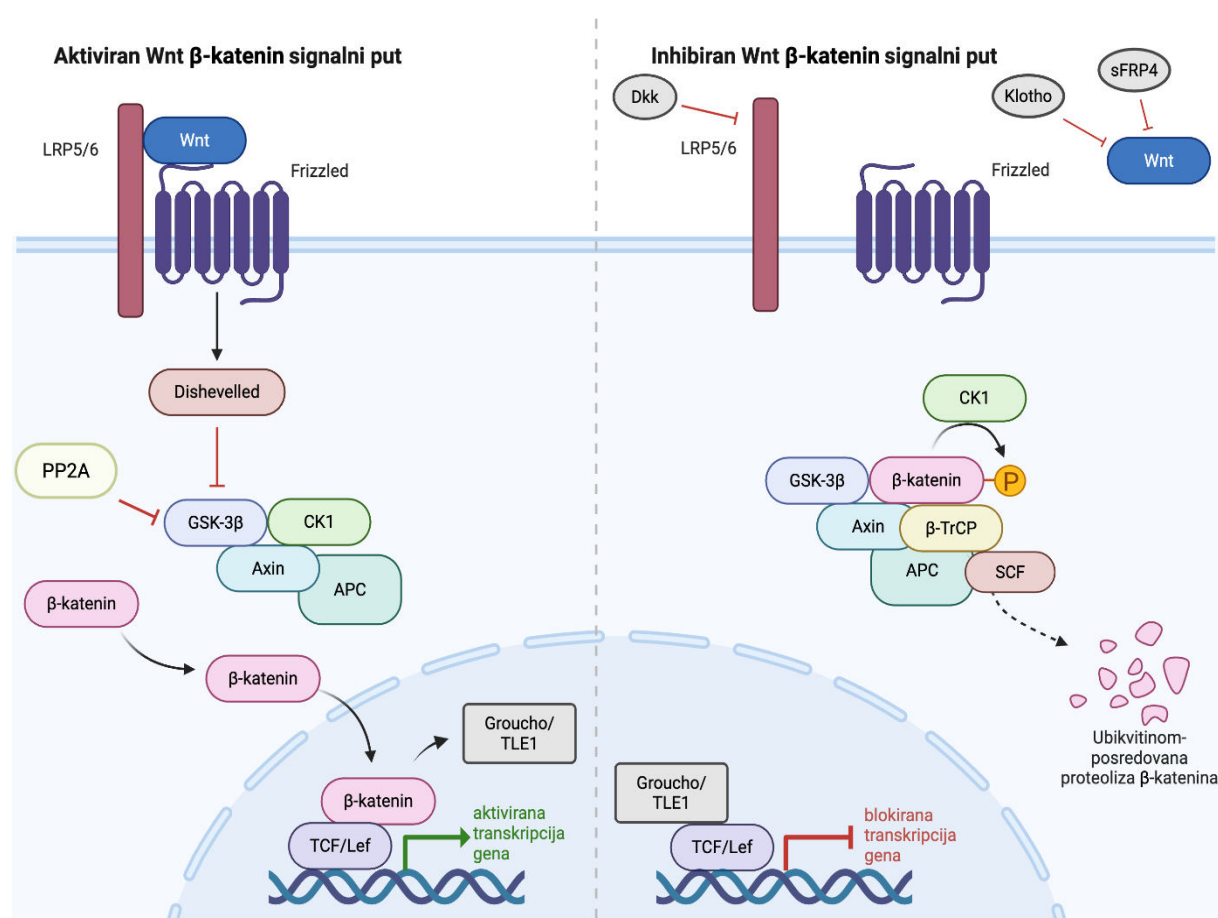
1.3.1. Kanonski (β -katenin ovisni) put

Kanonski Wnt signalni put, ujedno i najdetaljnije proučen oblik Wnt signalizacije, ključan je zbog svoje uloge u stabilizaciji β -katenina i njegovom premještanju u staničnu jezgru, zbog čega se naziva i β -katenin ovisnim putem. Glikogenska sintaza kinaza-3 β (GSK-3 β) zajedno s Axinom, adenomatoznim polipoza kolon (APC) proteinom, kazein kinazom 1 (CK1), E3-ubikvitin ligazom β -TrCP i protein fosfatazom 2A (PP2A), čini multiproteinski kompleks odgovoran za razgradnju β -katenina (Slika 4) (44).

Iako PP2A može djelovati pozitivno ili negativno na Wnt signalizaciju, ovisno o staničnom kontekstu, CK1 prvo fosforilira β -katenin na ostatku Ser45 u procesu koji se naziva „priming” (priprema) (45). Taj početni korak omogućuje GSK-3 β da dodatno fosforilira β -katenin na ostacima Ser33, Ser37 i Thr41, čime se stvara mjesto za vezanje β -TrCP proteina. β -TrCP tada djeluje kao adapterni protein koji se povezuje s Skp1/Cullin (SCF) sustavom i omogućuje ubikvitinaciju β -katenina, što ga označava za razgradnju putem proteasoma (40). U uvjetima kada Wnt ligandi nisu prisutni, ovaj kompleks cilja citosolni β -katenin za fosforilaciju i označava ga za proteosomsku razgradnju, čime se sprječava njegova akumulacija i djelovanje u jezgri. U normalnim okolnostima, kompleks je povezan sa staničnom membranom, no njegova aktivnost se inhibira kada se aktivira signalizacija. Naime, vezanjem određenih Wnt liganda na cistein bogatu domenu (CRD) membranskog receptora Frizzled i njegove ko-receptore LRP5/6 dolazi do regrutacije i aktivacije proteina Dishevelled (DVL), koji deaktivira razgradni kompleks. Time se omogućuje stabilizacija β -katenina, njegova akumulacija u citoplazmi te ulazak u staničnu jezgru, gdje β -katenin djeluje kao transkripcijski koaktivator, potičući ekspresiju gena uključenih u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje, što je ključno za aktivaciju kanonskog Wnt signalnog puta (Slika 4) (46, 47).

Geni koji su pod utjecajem kanonskog Wnt signalnog puta regulirani su putem β -katenina, koji se u jezgri veže za transkripcijske faktore TCF/Lef, što utječe na ključne stanične procese poput proliferacije, diferencijacije i preživljavanja (48). Genomske analize pokazale su da se β -katenin veže za TCF/Lef1 sekvence unutar pojačivača povezanih s genima odgovornima za diferencijaciju progenitorskih stanica, a transgenični eksperimenti dodatno potvrđuju postojanje regulatorne osi Wnt/ β -katenin/TCF (49, 50). U patološkim stanjima, pretjerana aktivacija ove signalne osi može dovesti do poremećaja u staničnoj funkciji, uključujući poticanje epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT), što je povezano s progresijom bolesti (51). TCF potiskuje ekspresiju gena interakcijom s represorskim proteinom Groucho (poznat kao TLE1 kod ljudi), koji potiče deacetilaciju histona i kondenzaciju kromatina. Stabilizacija i nakupljanje β -katenina u jezgri istiskuje Groucho te regrutira druge koaktivatore potrebne za aktivaciju gena, npr. CBP/p300, BCL9/LGS and Pygo koji potiču transkripciju ciljanih gena (52-54). TCF proteini, koji pripadaju obitelji DNA-vezujućih faktora, vežu se na specifične Wnt-responsivne elemente (WRE: C/T-C-T-T-T-G-A/T-A/T) i uzrokuju zakrivljenje DNA, što može promijeniti lokalnu strukturu kromatina (55). Funkcije TCF gena razlikuju se i djelomično preklapaju, pri čemu TCF1 i TCF4 mogu djelovati kao aktivatori ili represori, Lef1 je uglavnom aktivator, dok je TCF3 pretežno represor (56).

Različite samoregulacijske petlje unutar Wnt signalnog puta djeluju na specifičan način ovisno o tipu stanice, čime se dodatno povećava složenost kontrole intenziteta i trajanja Wnt odgovora. Sve je više dokaza da ključne komponente Wnt signalizacije - uključujući receptore Fz, ko-receptor LRP6, regulator Axin2, transkripcijske faktore TCF/Lef, antagoniste poput Naked i Dkk1, te R-Spondine (Rspo) mogu biti pozitivno ili negativno regulirane upravo putem TCF/ β -katenin mehanizma (57-59). Indukcija gena kao što su Axin2, Dkk1 i Naked te istovremena supresija Fz i LRP6 čine negativne povratne petlje koje služe za prigušivanje Wnt signalizacije i poboljšavaju stvaranje Wnt gradijenta na većim udaljenostima. Suprotno tome, pojačana ekspresija Rspo i TCF/Lef gena tvori pozitivne povratne petlje koje dodatno pojačavaju Wnt signal, što je osobito izraženo i iskorišteno u razvoju raka debelog crijeva (60).



Slika 4. Shematski prikaz aktiviranog i inhibiranog Wnt β -katenin signalnog puta. (Uređeno i prilagođeno pomoću BioRender.com aplikacije, pod licencom BioRender Academic License).

Iako je ovaj put relativno neaktivan u zdravim organima odraslih, signalizacija Wnt β -katenin ponovno se aktivira nakon bubrežne ozljede u životinjskim modelima i ljudskim bubrežnim bolestima, gdje može imati zaštitno, ali i štetno djelovanje (61).

1.3.2. Nekanonski (β -katenin neovisni) put

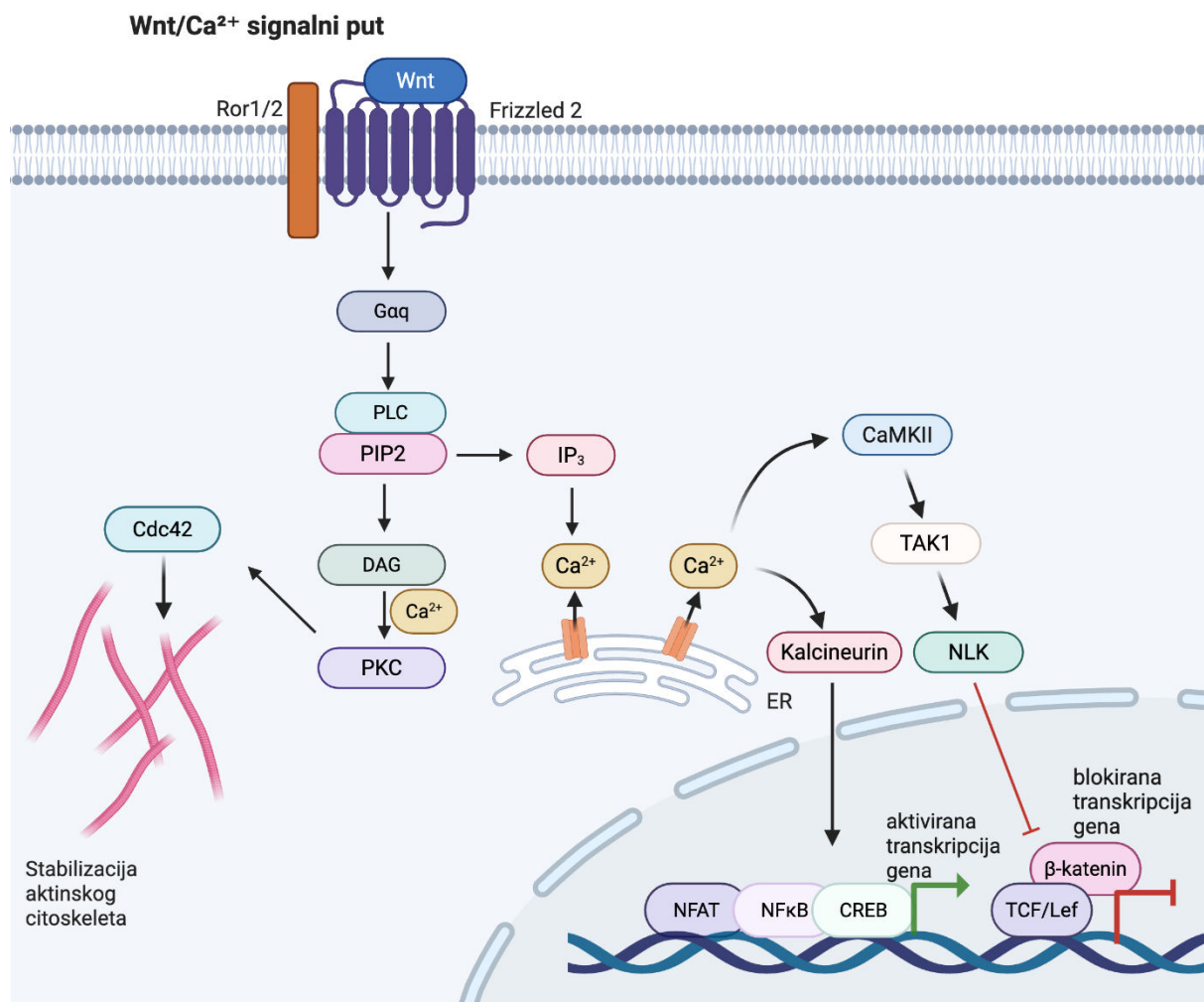
Nekanonski Wnt signalni putevi funkcioniraju neovisno o β -kateninu i uključuju različite unutarstanične mehanizme. Najpoznatiji među njima su Wnt/ Ca^{2+} put i put planarne stanične polarizacije. Wnt/ Ca^{2+} put regulira otpuštanje kalcija iz unutarstaničnih spremnika, čime aktivira niz signalnih molekula ovisnih o kalciju, uključujući protein kinazu C i kalcineurin. S druge strane, Wnt/PCP put kontrolira orijentaciju stanica unutar tkiva, reorganizaciju citoskeleta i staničnu migraciju putem aktivacije malih GTP-aza poput Rho i Rac, te c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) (62).

1.3.2.1. Wnt/ Ca^{2+} signalni put

U nekanonskom, kalcij-ovisnom Wnt signalnom putu, pretežno aktiviranom preko Wnt5a liganda i Fz2 receptora dolazi do aktivacije enzima fosfolipaze C (PLC), koja razgrađuje PIP2 u IP3 i DAG (63). Ovaj proces uzrokuje otpuštanje kalcija iz unutarstaničnih spremnika, čime se aktiviraju enzimi poput kalcineurina i CamKII. DAG, zajedno s Ca^{2+} aktivira PKC za stimulaciju ciklusa stanične diobe 42 (Cdc42), koji uzrokuje polimerizaciju aktina da doprinese polarizaciji i migraciji stanica (64). Aktivirani kalmodulin dodatno stimulira kinaze TGF- β -aktivirane kinaze 1 (TAK1) i nemo-sličnu kinazu (NLK), koje potom suzbijaju djelovanje kanonskog Wnt β -katenin puta (65). Kalcineurin također aktivira transkripcijske faktore kako što su nuklearni faktor aktiviranih T-stanica (NFAT), NF κ B i CREB, koji ulaze u staničnu jezgru i reguliraju ekspresiju specifičnih gena (Slika 5) (66). Važno je napomenuti da frizzled nije jedini transmembranski protein s kojim se Wnt5a može vezati. Naime, Wnt5a također veže receptor tirozin kinazu Ror1/2, čime aktivira Ca^{2+} /CaMKII put i ima ključnu ulogu u usmjeravanju aksona u mozgu sisavaca (67). Ovaj signalni mehanizam također ima važnu ulogu u ranim embrionalnim procesima, poput oblikovanja tjelesne osi, određivanja sudbine stanica te u održavanju ravnoteže tkiva. Interakcija između Wnt liganda i Frizzled receptora može aktivirati fosfodiesterazu 6 ovisno o prisutnosti kalcija, što dovodi do smanjenja razine cikličkog GMP-a (cGMP). Izolirana aktivacija Wnt5a/Ror signalnog puta potiče stvaranje molekula poput Siah2, kalpaina i CDX2. Siah2 snižava razinu β -katenina, dok kalcij-ovisna aktivacija kalpaina dovodi do razgradnje citoskeletnih proteina poput filamina i spektrina. CDX2 djeluje kao transkripcijski faktor i pokreće ekspresiju ciljnih gena (63).

Može se zaključiti da Wnt5a od najranijih stadija razvoja kralježnjaka posreduje u različitim signalnim procesima. Put Wnt/ Ca^{2+} ima ključnu ulogu u uspostavi dorzoventralne osi, upravljanju konvergentnim ekstenzijskim pokretima te u brojnim biološkim procesima,

počevši od razvoja različitih organa kao što su srce, mozak, skeletni sustav i bubrezi. Također ima ključnu ulogu u regulaciji stanične migracije i polariteta putem mehanizma planarne stanične polarnosti, pri čemu dolazi do reorganizacije citoskeleta, osobito elemenata povezanih s aktinom, filaminom i spektrinom. Osim toga, ovaj put značajno doprinosi imunološkom odgovoru jer transkripcijski faktor NFAT regulira ekspresiju citokina i sudjeluje u aktivaciji T-limfocita.



Slika 5. Shematski prikaz aktiviranog Wnt/Ca²⁺ signalnog puta. (Uređeno i prilagođeno pomoću BioRender.com aplikacije, pod licencom BioRender Academic License).

1.3.2.2. Wnt/PCP signalni put

Planarna stanična polarizacija predstavlja granu nekanonskog Wnt signalnog puta, neovisnog o β-kateninu, a ključna je za uspostavu organizacije stanica unutar epitelne ravnine tkiva, paralelno s površinom, odnosno u planarnom smjeru. Ovaj signalni mehanizam koordinira polaritet stanica duž tkiva i time omogućuje pravilnu morfogenezu, usmjeravanje stanične migracije te razvoj brojnih organskih sustava tijekom embriogeneze i u odraslom

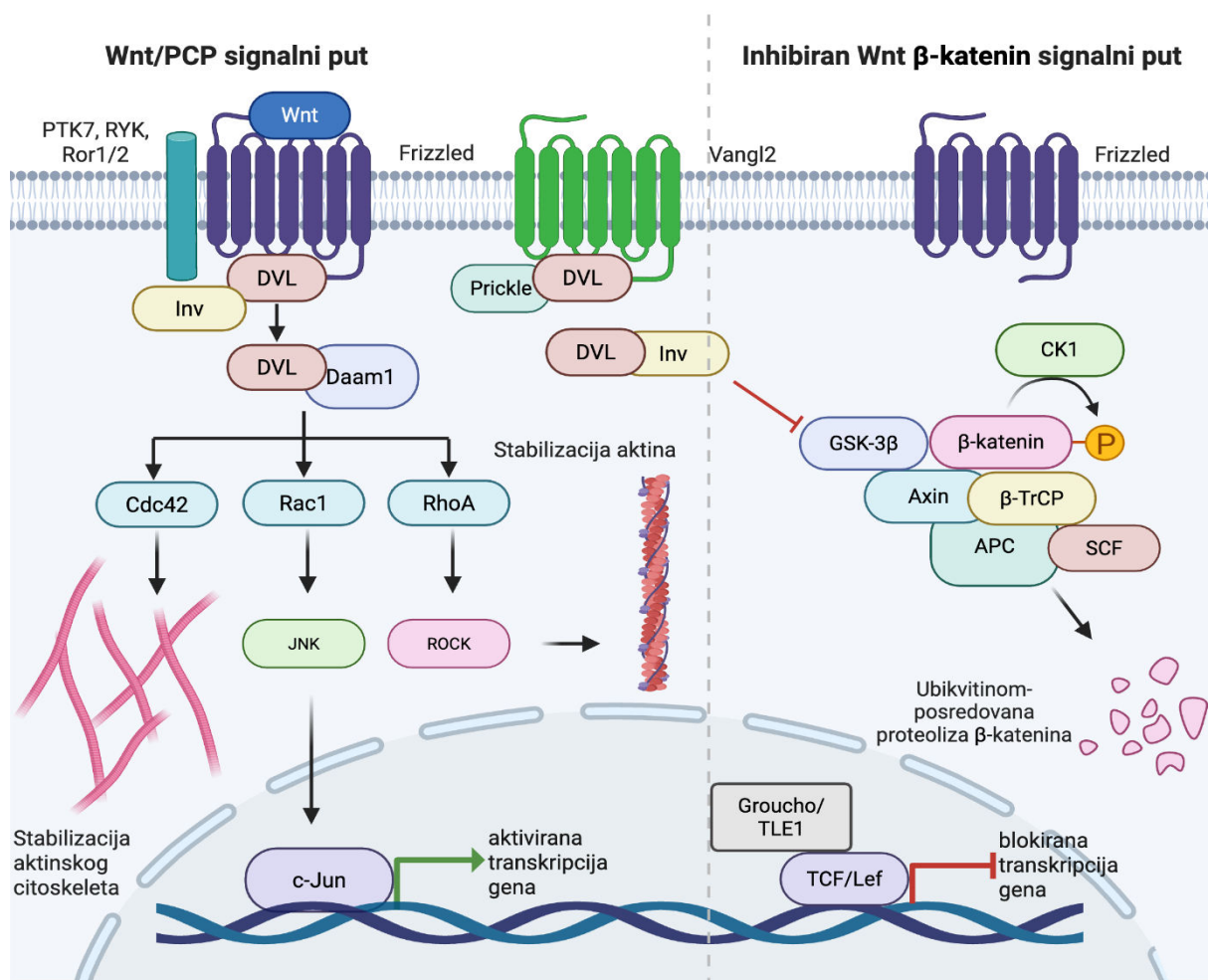
organizmu (68, 69).

PCP signalni put pokreće se vezanjem specifičnih Wnt liganda, najčešće Wnt5a i Wnt11, na Fz receptore i ko-receptor protein tirozin kinaza 7 (PTK7). Signal može biti posredovan i preko receptora poput Ror ili RYK, koji potom prenose signal prema intracelularnom adapteru DVL koji potom prenosi dalje prema nizvodnim efektorima, među kojima su ključni proteini Van Gogh-like (Vangl1/2), Prickle i Diego, koji doprinose uspostavi stanične polarizacije (70). Važan posrednik je i Daam1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1) tvoreći kompleks DVL-Daam1, koji povezuje signal s regulatorima citoskeleta, aktivirajući male Rho GTP-aze (RhoA, Rac1, Cdc42), te njihovu efektorsku molekulu RHO-ovisnu kinazu (ROCK) što dovodi do reorganizacije aktinske mreže i promjene u obliku, orijentaciji i migraciji stanica (Slika 6) (71, 72). Također, aktivacija JNK može potaknuti ekspresiju gena uključenih u morfogenetske procese (73).

Fiziološke funkcije PCP puta prepoznate su u brojnim aspektima embrionalnog razvoja. Tijekom gastrulacije, ovaj put upravlja konvergentnim ekstenzijskim pokretima stanica, čime doprinosi izduživanju embrija. U neurulaciji omogućuje pravilno zatvaranje neuralne cijevi, dok u razvoju oka i unutarnjeg uha usmjerava orijentaciju stanica mrežnice i osjetnih stanica (74, 75). PCP signalizacija sudjeluje i u formiranju unutarnjih organa, poput srca, bubrega i pluća, a neizostavna je i u regulaciji migracije imunoloških stanica (76).

Disfunkcija PCP signalnog puta povezuje se s nizom patoloških stanja. Mutacije ili poremećaji u komponentama ovog puta mogu uzrokovati defekte neuralne cijevi (npr. spina bifida), cistične bolesti bubrega, malformacije skeleta i srca, a utvrđena je i njegoa uloga u progresiji tumora, osobito u kontekstu invazije i metastaziranja, uslijed narušene stanične polarizacije i migracije (77).

Zahvaljujući svojoj ulozi u finom reguliranju stanične orijentacije i dinamike, PCP put se nameće kao ključno signalno čvorište u razvoju višestaničnih organizama i kao potencijalna meta u terapijskom pristupu određenim razvojnim i onkološkim bolestima.



Slika 6. Shematski prikaz aktiviranog Wnt/PCP i inhibiranog Wnt β-katenin signalnog puta. (Uređeno i prilagođeno pomoću BioRender.com aplikacije, pod licencom BioRender Academic License).

1.4. Wnt signalizacija u morfogenezi bubrega

Wnt signalizacija ima ključnu ulogu u brojnim razvojnim fazama bubrega, uključujući indukciju ureteričkog pupoljka, održavanje progenitorskih stanica i formiranje tubularne arhitekture. Disfunkcija ovih puteva može dovesti do različitih bubrežnih anomalija, uključujući hipoplaziju, cistične formacije i poremećaje u funkciji bubrega. Do sada je tijekom ontogeneze bubrega pronađeno ukupno 7 Wnt liganda, uključujući Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7b, Wnt9b i Wnt11 (78, 79).

Wnt2b i Wnt4 eksprimiraju se u mezenhimskim stanicama bubrega, pri čemu Wnt4 preko kanonskog i nekanonskog puta igra središnju ulogu u indukciji pronefrotskih tubula u početnim fazama razvoja bubrega (80, 81). Početak ekspresije Wnt4 u pronefrosu podudara se s transformacijom mezenhima u epitel. Nadalje, Wnt4 se može koordinirati s BMP4 kako bi

regulirao stanice glatkih mišića u medularnoj stromi za razvoj i sazrijevanje bubrežnih krvnih žila (82).

Wnt5a djeluje preko receptora Ror2 kako bi putem nekanonskog signalnog puta potaknuo razvoj metanefričkog mezenhima i morfogenezu bubrega. Osim Wnt5a, u ranom razvoju bubrega u ureteričkom pupoljku izraženi su i Wnt6, Wnt7b, Wnt9b i Wnt11 (83). Wnt6 može djelomično nadoknaditi nedostatak Wnt4, potičući njegovu ekspresiju i epitelizaciju uretera (84). Wnt7b je važan za formiranje kortikomedularne osi, a njegovo odsustvo rezultira izostankom medularne zone i smanjenom sposobnošću koncentracije urina (85).

Stanice koje izražavaju Wnt9b imaju ključnu indukcijsku ulogu u metanefričkom mezenhimu, što je presudno za razvoj mezonefričkih i metanefričkih tubula te za izduživanje Müllerova kanala. Kako bi se održala ravnoteža između održavanja mezenhimskih progenitorskih stanica i njihove diferencijacije putem MET, Wnt9b regulira koje će skupine progenitorskih stanica ostati nediferencirane, a koje će započeti diferencijaciju (86). Wnt11 je prvotno identificiran kao gen izražen u nefričkom kanalu prije izrastanja ureteričkog pupoljka, gdje ima ulogu u regulaciji njegovog grananja (87).

1.4.1. Kanonski Wnt put

Kanonska Wnt signalizacija ima ključnu ulogu u embrionalnom razvoju bubrega, pri čemu sudjeluje u različitim fazama nefrogeneze. Aktivni oblik β -katenina može se detektirati već u vrlo ranim stadijima razvoja mišjeg embrija (E6.5), gdje doprinosi formiranju AP osi, primitivne pruge i mezoderma (88). U kasnijim fazama, signalizacija putem β -katenina pomaže uspostaviti ravnotežu između održavanja populacije bubrežnih progenitorskih stanica i njihove diferencijacije u funkcionalne nefrone. Wnt β -kateninska signalizacija nedvojbeno ima ključnu ulogu u razvoju bubrega, no pritom su količina signalizacije te prostorna i vremenska ekspresija od presudne važnosti. Kako bi se omogućila precizna regulacija ovog signalnog puta, vjerojatno postoji više modulatora koji ga nadziru. Jedan od inhibitora Wnt signalizacije u ranom metanefričkom mezenhimu je transkripcijski faktor Six2. U svom neinduciranom stanju, MM sadrži multipotentne progenitorske stanice, a pokazano je da Six2 održava ovu staničnu populaciju u stanju samoobnavljajućih progenitora. Suprotno tome, aktivacija Wnt signalizacije usmjerava te stanice prema diferencijaciji u nefronske progenitore (49).

β -katenin ima ulogu u tranziciji mezenhima u epitel tijekom razvoja bubrežnog mjehura, pri čemu njegova smanjena aktivnost omogućuje potpunu epitelizaciju i neophodan da mezenhimalni progenitori induciraju stvaranje bubrežnih mjehurića (89). Osim toga,

nuklearni β -katenin, aktivni oblik β -katenina, također je snažno eksprimiran u medularnim stanicama bubrežne strome. Studije s miševima koji eksprimiraju TCF/ β -gal reporterski sustav osjetljiv na β -katenin pokazale su prisutnost kanonske Wnt signalizacije u epitelu razgranatog UB i MM, dok se taj signal znatno smanjuje u diferenciranim nefronima i potpuno nestaje u postnatalnim bubrezima (90). β -cats^{-/-} miševi, model uvjetnog knockوتا s delecijom β -katenina specifičnom za bubrežnu stromu, pokazuju oštećenu kondenzaciju stanica metanefričkog mezenhima i smanjenu ekspresiju Wnt9b u epitelu uretera, što dovodi do abnormalnog MET-a (91).

Sveukupno, studije ukazuju na to da β -katenin ima ključnu ulogu u regulaciji genske ekspresije unutar urotelnog epitela, pri čemu održava razvoj i grananje ureteričkog pupoljka. Eksperimentalna delecija β -katenina u epitelu Wolffovog kanala korištenjem homeobox B7 (Hoxb7)-Cre sustava rezultira ozbiljnim defektima u razvoju bubrega, uključujući poremećaje grananja ureteričkog pupoljka te pojavu renalne aplazije ili hipoplazije (92). Daljnja istraživanja, provedena na mišjim modelima s ciljanom delecijom β -katenina pomoću Pax8-Cre sustava, pokazala su da je ovaj signalni put nužan i u kasnim fazama nefronogeneze, osobito u stadiju S-oblika. Takvi miševi razvili su niz strukturnih i funkcionalnih abnormalnosti, uključujući smanjenu funkciju bubrega, hipoplastični parenhim, stanjen korteks, odsutnost površinskog sloja tubula i manjak parijetalnih epitelnih stanica Bowmanove čahure (93).

Svi navedeni rezultati snažno upućuju na to da je kanonski Wnt β -katenin signalni put nezamjenjiv u koordinaciji staničnih odluka i morfogeneze tijekom svih ključnih faza razvoja bubrega. Ipak, valja uzeti u obzir da dio učinaka β -katenina može biti posljedica njegove uloge u regulaciji staničnih adhezijskih kompleksa, a ne isključivo transkripcijske aktivnosti.

1.4.2. Nekanonski Wnt put

Sve veći broj istraživanja potvrđuje ključnu ulogu nekanonskog Wnt signalnog puta, posebno planarne stanične polarizacije, u razvoju i funkciji bubrega. Wnt/ Ca^{2+} i Wnt/PCP signalni put ne samo da su komplementarni kanonskom putu, već predstavljaju autonomni i esencijalan regulator u preciznom oblikovanju arhitekture i funkcije bubrega, time predstavljaju temeljni mehanizam za pravilnu morfogenezu bubrega.

Wnt/ Ca^{2+} /NFAT put može funkcionirati kao nizvodni efektor za Wnt4 signalizaciju u agregatima pretubularnih stanica (94). Citoplazmatski kalcineurin-ovisni NFAT faktori eksprimiraju se u ranim stanicama koje formiraju nefrone, dok inhibitor kalcineurina inhibira

nefrogenezu. Štoviše, eksperimentalno povećani unutarstanični kalcij djelomično spašava fenotip nedostatka Wnt4 ispravljanjem neuspjeha u nefrogenezi. Wnt4 također može inducirati priljev Ca^{2+} i CaMKII u primarnim MM stanicama (95). Ovi dokazi upućuju na to da Wnt4 induciran Wnt9b/ β -kateninom funkcionira u mezenhimu barem djelomično putem Ca^{2+} /NFAT puta kako bi potaknuo MET.

Komponente PCP puta izražene su u ključnim epitelnim strukturama razvijajućeg bubrega - ureteričkom pupoljku, bubrežnim mjehurićima (Rv) i S-oblikovanim tijelima — gdje sudjeluju u regulaciji stanične diobe, pokreta, adhezije i morfogeneze nefrona. Više sustavnih analiza povezalo je funkciju PCP signalizacije s grananjem i izduživanjem UB-a, čime se određuju promjer, duljina i oblik bubrežnih tubula (96).

PCP protein Vangl2 prisutan je u više struktura – ureteričnom pupoljku, sabirnim kanalićima, mezenhimu i nefronima, a njegova mutacija rezultira cističnim bubrežima i oštećenjem grananja. Specifična delecija *Vangl2* u podocitima dovodi do manjih glomerula s poremećajem sazrijevanja, što ističe njegovu važnost za morfologiju i funkciju podocita (97). Slično tome, protein Fat4 sudjeluje u regulaciji stanične diobe i elongacije tubula te u interakciji s Vangl2 sprječava nastanak cističnih formacija (98). Receptori Fz8 i Fz3 pokazali su se kao važni čimbenici u kasnoj diferencijaciji pronefričkih tubula i kanala, djelujući kroz nekanonski Wnt/JNK put (99).

Analize transgeničkih miševa pokazale su da mutacije u Wnt ligandima, uključujući *Wnt5a*, *Wnt7b*, *Wnt9b* i *Wnt11*, uzrokuju različite defekte u razvoju UB-a. Na primjer, *Wnt5a* preko receptora Ror2 i regulira širenje nefričkog kanala; njegovo isključenje dovodi do dupliciranih uretera i bubrega uslijed poremećenog GDNF signaliziranja (100). Nakon što je induciran mezenhim, Wnt9b nastavlja imati ključnu ulogu u kasnijim fazama nefrogeneze, posebno u regulaciji planarne stanične polarizacije i interkalacije stanica tijekom tubulogeneze putem konvergentne ekstenzije. Kod hipomorfnihih miševa s djelomično smanjenom ekspresijom Wnt9b razvijaju se bubrežne ciste koje potječu iz proksimalnih zavijenih tubula, što je povezano s poremećajem u aktivaciji Rho GTPaza i Jun kinaza (101).

Još jedna važna komponenta PCP signalnog puta, Daam1, prisutna je tijekom razvoja pronefrosa i djeluje putem Rho-GEF proteina. Gubitak Daam1 rezultira smanjenom ekspresijom kasnih epitelnihih markera i inhibicijom pronefrosne tubulogeneze. Slično tome, istraživanja na žabama pokazala su da smanjena izraženost komponenti poput Daam1 i Rho dovodi do poremećaja u kasnoj morfogenezi pronefričnih tubula i kanala. Ipak, pronefrične stanice pritom zadržavaju sposobnost diferencijacije, što upućuje na to da Wnt/PCP

signalizacija ima važnu ulogu i nakon mezenhimalno-epitelne tranzicije (102). Razumno je zaključiti da Wnt/PCP signalizacija regulira sazrijevanje nefrona nakon početne indukcije i faza MET-a.

1.4.3. Međusobne interakcije i izmjene kanonskog i nekanonskog puta

Precizna koordinacija i izmjena između kanonske i nekanonske Wnt signalizacije ključna je za ravnotežu između proliferacije, diferencijacije i morfogeneze tijekom razvoja bubrega. Istraživanje provedeno korištenjem embrija *Xenopusa* pokazuje da kanonska Wnt signalizacija, posredovana putem β -katenina, pojačava proliferaciju stanica u ranim fazama formiranja bubrega. Suprotno tome, nekanonski Wnt signalni putevi, poput PCP, djeluju tako da inhibiraju ovu proliferaciju (103). U razvojnog modelu pronefrosa kod *Xenopusa*, smanjenje nekanonske signalizacije, upotrebom mutiranih oblika DVL2 s promijenjenom PDZ domenom, rezultiralo je povećanom staničnom proliferacijom, dok je isključivanje kanonskih signala dovelo do suprotnog učinka. Ova studija ističe da, osim poznatog međusobnog antagonizma, kanonski i nekanonski Wnt putevi također imaju suprotne učinke na regulaciju stanične diobe.

Naime, kanonska Wnt signalizacija potiče proliferaciju stanica regulacijom ciklina, konkretno povećanjem ekspresije *cyclin D1* i *cyclin D2* te smanjenjem izlaska stanica iz staničnog ciklusa (104). Istovremeno, napredovanje kroz G2/M fazu ciklusa potrebno je za aktivaciju Wnt receptora i samu kanonsku signalizaciju (105) čime se uspostavlja pozitivna povratna petlja koja dodatno potiče proliferaciju. Iako nekanonski Wnt signalni putevi ne djeluju izravno na proliferaciju stanica, poznato je da značajno reguliraju stanično ponašanje, migraciju i orijentaciju ravnine stanične diobe (101).

Identificirani su različiti unutarstanični inhibitori kanonskog puta, a nekoliko njih djeluje na DVL protein, djelujući kao prekidači koji preusmjeravaju signalizaciju kroz nekanonski put. Jedan od dobro istraženih je inversin i djeluje kao molekularni prekidač između različitih Wnt signalnih putova (Slika 6). On inhibira kanonski Wnt signalni put usmjeravanjem citoplazmatskog proteina DVL1 na razgradnju. Istovremeno, inversin je nužan za konvergentne ekstenzijske pokrete tijekom gastrulacije u embrijima *Xenopus laevis* te za elongaciju eksplanata životinjske kape. U zebrica, strukturno srodan prekidački protein diversin može ublažiti bubrežne ciste uzrokovane gubitkom inversina, što upućuje na to da je inhibicija kanonskog Wnt puta nužna za normalan razvoj bubrega. Također, protok tekućine povećava razinu inversina u ciliarnim tubularnim stanicama, čime sudjeluje u regulaciji ovog

ključnog prijelaza između Wnt signalnih puteva tijekom razvoja bubrega (106). Brojne studije potvrdile su da je β -kateninska signalizacija glavni regulator epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) tijekom embrionalnog razvoja, dok je Wnt-inducirani EMT povezan s akumulacijom p53, pri čemu je uočen porast ekspresije p53 mRNA kao odgovor na oštećenje cilija. Gubitak cilija u ozlijeđenim tubularnim epitelnim stanicama može tako potaknuti prelazak s nekanonske na kanonsku Wnt signalizaciju, čime se dodatno pospješuje EMT i doprinosi progresiji kronične bubrežne bolesti (107).

1.5. CAKUT i poremećaji Wnt signalizacije

Kongenitalne anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT) predstavljaju razvojni poremećaj bubrega i/ili uro-genitalnog trakta, koji obuhvaća širok spektar strukturnih malformacija - od teških oblika poput ageneze bubrega, do potencijalno blažih stanja poput vezikoureteralnog refluksa (Tablica 1). CAKUT čini oko 40-50 % slučajeva kronične bubrežne bolesti u djece te gotovo 10 % slučajeva kod odraslih diljem svijeta (108, 109). U ljudi se pojavljuje s učestalošću od približno 1 na 500 fetalnih ultrazvučnih pregleda (110). Do danas su mutacije u otprilike 54 gena potvrđene kao uzrok CAKUT-a u ljudi, što doprinosi s 12-20 % u ukupnoj etiologiji bolesti (111). Istraživanja na životinjama pokazala su da promjene u genima ključnima za razvoj bubrega mogu inducirati CAKUT, dok su analize ekspresije otkrile da nepravilno pozicioniranje ili abnormalna razina proteina koje kodiraju ti geni mogu biti uključeni u nastanak CAKUT-a u ljudi (112, 113).

Tablica 1. Prikaz, opis i kliničke značajke CAKUT fenotipova.

Fenotip	Opis	Razvojno podrijetlo / Kliničke značajke
Ageneza bubrega	Potpuni izostanak formiranja jednog (unilateralna) ili oba (bilateralna) bubrega.	Bilateralna je letalna, unilateralna može biti asimptomatska ali povećava rizik od bolesti preostalog bubrega.
Hipoplazija bubrega	Smanjeni bubreg s normalnom morfologijom, ali smanjenim brojem nefrona.	Smanjena funkcionalna rezerva bubrega, često uzrokuje hipertenziju i kroničnu bubrežnu bolest.
Displazija bubrega	Nepravilna struktura bubrega	Može biti jednostrana ili obostrana,

	zbog poremećenog razvoja nefrona i tubula, često s prisutnim cistama.	povezana s mokraćnim opstrukcijama i lošom funkcijom bubrega.
Multicistična displastična bolest bubrega (MCDK)	Bubreg zamijenjen više nespojenim cistama; parenhim gotovo u potpunosti odsutan.	Obično unilateralna, nefunkcionalna; često spontano regredira.
Ektopični bubreg	Bubreg koji nije migrirao u svoj uobičajeni položaj u retroperitoneumu (često nalazi se u zdjelici).	Može biti asimptomatski ili predisponirati infekcijama i refluksu.
Potkovičasti bubreg	Spojeni donji polovi oba bubrega u obliku potkove, s ograničenom rotacijom i migracijom.	Povezano s opstrukcijom, refluksom i većom učestalošću Wilmsovog tumora.
Dvostruki ureter (duplex ureter)	Prisutnost dvostrukog sustava uretera, djelomično ili potpuno.	Može uzrokovati hidronefrozu, refluks, ili ureterokelu.
Ureterokela	Cistično proširenje distalnog dijela uretera unutar mokraćnog mjehura.	Često udružena s duplikacijom uretera; može uzrokovati opstrukciju.
Hidronefroza	Proširenje bubrežne zdjelice i čašica zbog opstrukcije u protoku mokraće.	Može biti posljedica opstrukcije ureterovezikalnog/ureteropelvičnog spoja; zahtijeva praćenje funkcije i razvoja bubrega.
Vezikoureteralni refluks (VUR)	Povratni tok mokraće iz mjehura prema ureteru i bubregu zbog disfunkcionalnog ureterovezikalnog spoja.	Povezan s ponavljajućim infekcijama mokraćnog sustava i ožiljcima bubrega.
Stražnji uretralni zalistak (PUV)	Kongenitalna opstrukcija stražnje uretre, gotovo	Teška forma opstruktivne uropatije u novorođenačkoj dobi; može

	isključivo u muškaraca.	dovesti do bubrežnog zatajenja.
Hipoplazija mokraćnog mjehura	Nerazvijenost mokraćnog mjehura, što ograničava njegov kapacitet i sposobnost pražnjenja.	Može dovesti do retencije urina i sekundarnog oštećenja bubrega.
Megamjehur	Patološki povećani mjehur u odsustvu opstrukcije.	Može se pojaviti prenatalno; često povezan s neurogenim mokraćnim mjehurom.
Prune belly sindrom	Rijetki sindrom obilježen defektima trbušnih mišića, bilateralnom kriptorhizmom i mokraćnim abnormalnostima.	Potrebna multidisciplinarna skrb; može dovesti do bubrežnog zatajenja.

Treba istaknuti da je CAKUT vrlo heterogena skupina poremećaja, što se očituje u različitim obrascima nasljeđivanja - može biti nasljedan ili, češće, sporadičan, te se može prenositi autosomno dominantno ili recesivno. Poremećaj može biti posljedica mutacije jednog gena ili rezultirati kombinacijom mutacija u više gena (114, 115). Autosomno dominantni način nasljeđivanja s varijabilnom penetracijom, kao i pojava CAKUT-a unutar obitelji, zabilježeni su u približno 15% slučajeva.

Tijekom proteklih desetljeća uloženi su značajni naponi u razjašnjavanje ekspresije, uloge i ciljanih molekula Wnt β -katenin signalizacije tijekom normalnog razvoja bubrega i u patogenezi CAKUT-a. Izmjene regulacije ovih signalnih puteva, poput abnormalne aktivacije kanonske Wnt signalizacije, povezuje se s razvojem CAKUT-a, pri čemu dolazi do poremećaja ključnih procesa poput grananja ureteričkog pupoljka, što naglašava njihovu važnost za pravilnu nefrogenezu (Tablica 2) (116).

Tablica 2. Komponente Wnt signalnog puta u životinjskim modelima i fenotipovi mokraćnog sustava kod ljudi (117).

Wnt komponenta	Životinjski model	Fenotip mokraćnog sustava kod ljudi
Ekstracelularni segment		
Wnt3	<i>Wnt3</i> ^{-/-} miševi ne mogu razviti mezoderm,	Tetra-amelija sindrom

	knockdown u zebrafishu rezultira malformacijama kloake	
Wnt4	<i>Wnt4</i> ^{-/-} miševi ugibaju ubrzo nakon rođenja, regresija Müllerovog kanala i disgeneza bubrega	SERKAL sindrom
Wnt5a	<i>Wnt5a</i> ^{-/-} miševi imaju CAKUT, knockdown u zebrafishu uzrokuje glomerularne ciste i dilataciju bubrežnih tubula	Robinow sindrom
Wnt6	N/A	N/A
Wnt7b	<i>Wnt7b</i> ^{-/-} miševi nemaju bubrežnu medulu	N/A
Wnt9b	<i>Wnt9b</i> ^{-/-} miševi umiru unutar 24 h od rođenja, imaju rudimentarne bubrege; <i>Wnt9b</i> ⁻ /flox miševi razvijaju cistične bubrege	Bilateralna ageneza bubrega
Wnt11	<i>Wnt11</i> ^{-/-} miševi imaju poremećenu razgranatost ureteričnog pupoljka i smanjen broj glomerula	N/A
WLS	Knock-in miševi s WLS mutacijama pokazuju cističnu medularnu hidronefrozu	Zaki sindrom
Membranski segment		
Fz	Fz4 i Fz8 double knockout miševi imaju poremećaj rasta UB-a i veličine bubrega	N/A
LRP5/6	<i>Lrp</i> ^{-/-} miševi imaju	N/A

	hipoplastične i/ili cistične bubrege	
Citoplazmatski segment		
DVL	N/A	Robinow sindrom
APC	Uvjetna delecija APC u miševa dovodi do pojave brojnih bubrežnih cista	N/A
β -katenin	Uvjetna delecija ili prekomjerna ekspresija uzrokuje različite defekte bubrega	N/A

N/A, nije primjenjivo; označava da je odnos između fenotipa i gena još uvijek nesiguran.

1.5.1. Hipoplazija

Hipoplazija bubrega u sklopu CAKUT predstavlja značajan klinički entitet koji se često javlja u pedijatrijskoj nefrologiji. Ona obuhvaća smanjenje veličine bubrega uz očuvanu, ali reduciranu funkcionalnu strukturu, što može dovesti do progresivne bubrežne insuficijencije (118). Poremećaji u procesu grananja kada ureterični pupoljak ulazi u okolni metanefrički mezenhim mogu rezultirati hipoplazijom bubrega (119). Istraživanja na životinjama pokazala su da rana opstrukcija dovodi do apoptoze ureteričkog pupoljka i hipoplazije, zajedno s cističnom displazijom. Suprotno tome, opstrukcija koja se dogodi kasnije u gestaciji rjeđe dovodi do displazije, ali i dalje može uzrokovati bubrežnu hipoplaziju (120).

Prepoznaju se tri klasična oblika hipoplazije bubrega, koji se razlikuju po morfološkim i funkcionalnim karakteristikama:

1. Jednostavna hipoplazija - uniformno smanjen bubreg sa smanjenim brojem nefrona, ali bez cističnih ili displastičnih promjena.
2. Oligomeganefronska hipoplazija (oligomeganephronia) - vrlo mali broj, ali značajno uvećani nefroni; često dovodi do hiperfiltracije i brze progresije bubrežnog oštećenja.
3. Segmentna hipoplazija (Ask-Upmark bubreg) - karakterizirana lokaliziranom hipoplazijom pojedinih reznjeva bubrega, često udruženom sa sekundarnom hipertenzijom (121, 122).

Dodatno, iako rijetko formalno klasificirana, postoji i:

4. Kortikalna hipoplazija - obilježena stanjenjem korteksa i smanjenim brojem generacija nefrona, uz moguće redukcije medularne mase.

Na fetalnom ili postnatalnom ultrazvuku, bubrežna hipoplazija definira se kao volumen bubrega manji od 2 standardne devijacije u odnosu na prosjek ili kao ukupni volumen oba bubrega manji od polovice normalnog volumena za dob, pri čemu je očuvan normalan oblik bubrega i kortikomedularna diferencijacija (123). Sve podvrste karakterizirane su težinom manjom od 2 standardne devijacije i smanjenim brojem bubrežnih reznjeva, osim kod kortikalne hipoplazije. Međutim, smanjen broj nefrona ili oligonefronija nije nužno obilježje bubrežne hipoplazije jer se oligonefronija može javiti i kod bubrega normalne veličine a ima i povećan rizik za hipertenziju i kroničnu bubrežnu bolest (CKD) u odrasloj dobi (124). U prosjeku, zdravi bubreg sadrži oko milijun nefrona.

Iako hipoplazija bubrega može biti otkrivena već u ranom djetinjstvu zbog smanjenog volumena bubrega ili urođenih anomalija, u mnogim slučajevima ostaje klinički tiha i neprepoznata sve do kasnijeg djetinjstva ili čak odrasle dobi. Tada se može prvi put manifestirati kroz proteinuriju, arterijsku hipertenziju i progresivno oštećenje bubrežne funkcije. Ove kasne komplikacije u skladu su s poznatom Brennerovom hipotezom, koja tvrdi da smanjen broj nefrona dovodi do kompenzatorne glomerularne hiperfiltracije (125). Taj proces, dugoročno, uzrokuje gubitak podocita, što rezultira proteinurijom i hipertenzijom. Uslijed toga dolazi do daljnjeg oštećenja glomerula, fibroze i, naposljetku, progresije ka kroničnom zatajenju bubrega. Korištenje inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE inhibitora) i blokatora angiotenzinskih receptora tijekom trudnoće povezano je s pojavom bubrežne hipoplazije kod novorođenčadi, osobito kada se ti lijekovi uzimaju tijekom drugog i trećeg tromjesečja, u kojem se inače odvija eksponencijalno povećanje broja nefrona (126).

Poremećaji u procesu grananja, kao i disfunkcija Wnt β -katenin signalizacije, i gena poput *Wnt4*, *Wnt9B* i *β -katenina* ključnih za indukciju nefrona, mogu rezultirati hipoplazijom ili potpunom agenezom bubrega (127, 128).

Hipoplazija bubrega rijetko se javlja kao izolirana anomalija; u većini slučajeva dio je šireg spektra razvojnih poremećaja mokraćnog sustava ili je udružena s genetskim sindromima poput Branchio-oto-renalnog sindroma, Renal-coloboma sindroma ili Piersonovog sindroma (129). Također, često se javlja zajedno s drugim oblicima CAKUT-a, poput vezikoureteralnog refluksa, displazije bubrega ili ureterične stenoze, čime se dodatno povećava rizik od progresije prema kroničnoj bubrežnoj bolesti.

1.5.2. Displazija

Spektar renalne displazije obuhvaća skupinu bubrežnih bolesti koje su obilježene poremećenim razvojem bubrega, što dovodi do stvaranja displastičnog bubrežnog tkiva u jednom ili oba bubrega. Ova se patološka promjena može pojaviti segmentalno ili difuzno, jednostrano ili obostrano. U taj spektar spadaju renalna displazija, hipodisplazija, cistična displazija bubrega, multicistični displastični bubreg te renalna aplazija/ageneza (130).

Renalna displazija je histološki definirana i karakterizira je prisutnost primitivnih kanalića te poremećena organizacija reznjica bubrega. Primitivni kanalići obloženi su nediferenciranim ili cilindrično-kubičnim epitelom i okruženi vezivno-mišićnim prstenom sastavljenim od vretenastih stanica poredanih kružno. Cjelokupna arhitektura korteksa i medule bubrega pokazuje dezorganizaciju, s narušenom diferencijacijom nefrona i povećanim udjelom nezrelog, rahlog mezenhimalnog stromalnog tkiva (131).

Najčešća kongenitalna anomalija bubrega i mokraćnog sustava u kliničko-patološkom smislu je bubrežna hipodisplazija (132). Može se dijagnosticirati kao sporadičan slučaj ili u obiteljskim skupinama. Za obiteljske slučajeve, predloženi način nasljeđivanja u većini rodoslovlja je autosomno dominantan s varijabilnim izrazom i smanjenom penetrancijom, koja se procjenjuje na 50% do 90% (133). Bubrežna displazija je razvojni poremećaj bubrega koji pogađa 1 od 250 živorođenih (134). Ovaj poremećaj može dovesti do bubrežnog zatajenja u djetinjstvu, kronične bubrežne insuficijencije u odrasloj dobi i hipertenzije.

Tijekom normalnog razvoja bubrega, β -katenin se eksprimira u epitelu ureteričnog pupoljka, metanefričkom mezenhimu i bubrežnoj stromi, što sugerira njegovu patogenetsku ulogu u bubrežnoj displaziji (135). Manipuliranjem razina β -katenina u životinjskim modelima, istraživanja su pružila značajan uvid u normalne i patogene uloge β -katenina u formiranju bubrega i nastanku bubrežne displazije.

Iako je displazija obično klinička dijagnoza podržana radiološkim značajkama, histopatološke studije ljudskih fetalnih autopsija pokazale su da je displazija karakterizirana arhitektonskom distorzijom, metaplazijom, primitivnim glomerulima i tubulima te formiranjem cisti. Značajke koje na prenatalnom ultrazvuku upućuju na renalnu displaziju uključuju hipoehogene bubrege sa slabom ili smanjenom kortikomedularnom diferencijacijom i/ili difuznim stanjivanjem korteksa, uz prisutnost ili bez prisutnosti cisti. Displastični bubrezi mogu biti manji, normalne veličine ili znatno veći od zdravih bubrega, a mogu pokazivati i cistične promjene. Bubrežna displazija može se klinički manifestirati s poliurijom i gubitkom elektrolita uz oštećenu bubrežnu funkciju.

1.5.3. Dvostruki ureter

Anatomska anomalija bubrega s dvostrukim ureterom (UD) karakterizirana je djelomičnim ili potpunim udvostručenjem uretera, a nastaje kada dolazi do abnormalne formacije ili migracije ureteričkog pupoljka iz nefričkog kanala. Sustavi duplikacije bubrega mogu imati različite fenotipske oblike. Kod nepotpune duplikacije, gornji i donji pol bubrega dijele isti ureteralni otvor u mokraćnom mjehuru. Takvi duplikatni bubrezi s razdvojenom bubrežnom zdjelicom ili ureterom nastaju kada se izvorno jedan ureterični pupoljak podijeli prije nego što dosegne metanefrički mezenhim. Potpuna duplikacija, koja je znatno češća, nastaje kada iz nefričkog kanala izbiju dva zasebna ureterična pupoljka. U većini slučajeva, donji pol bubrega razvija se normalno, dok je gornji pol promijenjen. Ovo se objašnjava činjenicom da ektopični ureterični pupoljak najčešće izbija ispred normalnog, potičući time formiranje gornjeg pola duplikatnog bubrega (136). Inverzna Y-duplikacija uretera je rijetka anomalija kod koje dva uretera izlaze iz jednog normalnog bubrega. Smatra se da nastaje spajanjem dvaju zasebnih ureteričnih pupoljaka neposredno prije ili u trenutku kada dolaze do zametka bubrega (137). U literaturi su također zabilježeni vrlo rijetki slučajevi uretera u obliku slova H. Iako većina slučajeva uključuje jednostavnu duplikaciju, opisani su i multipli ureteri - u nekim slučajevima čak do šest zasebnih pupoljaka. Dodatni ureteri mogu biti ektopični i ne uspijevaju se povezati ni s mokraćnim mjehurom ni s bubregom, što dovodi do tzv. slijepog završetka uretera (138).

Disregulacija Wnt signalnog puta, koji sudjeluje u procesu formiranja i grananja ureteričkog pupoljka, može voditi do abnormalne topografije ureteričkih izdanaka, što se klinički može očitovati kao dvostruki ureter. U eksperimentalnim modelima, miševi s ciljanim gubitkom funkcije Wnt5a gena razvijaju dvostruke bubrege i uretere na obje strane tijela, što je rezultat abnormalnog formiranja više UB-ova. Pritom je intermedijarni mezoderm skraćen i proširen, što implicira da Wnt5a regulira rano oblikovanje i prostornu organizaciju ovog tkiva, ključnog za pravilnu poziciju i broj ureteričkih pupoljaka (139).

Osim toga, dvostruki ureter može biti posljedica i poremećaja u vremenskoj i prostornoj kontroli ekspresije GDNF i njegovih receptora, ali i Wnt signalnih komponenti, kao što je Wnt11 (140). Studije su pokazale da prekomjerna aktivacija β -katenina dovodi do ektopične formacije dodatnih ureteričkih pupoljaka, što rezultira potpunom duplikacijom uretera i bubrega (141).

1.5.4. Potkovičasti bubreg

Potkovičasti bubreg nastaje kada se tijekom embrionalnog razvoja donji (ili rjeđe gornji) polovi oba metanefrička pupoljka spoje, formirajući istmus koji povezuje oba bubrega. Ova fuzija može ometati normalnu migraciju bubrega prema kranijalnom položaju, što rezultira njihovim nižim smještajem u abdomenu. Potkovičasti bubreg često je asimptomatski, ali može biti povezan s povećanim rizikom za opstrukciju uretera, infekcije mokraćnog sustava, nefrolitijazu i razvoj tumora.

Iako direktna povezanost između Wnt signalnog puta i potkovičastog bubrega nije u potpunosti razjašnjena, postoje indicije da poremećaji u ovom signalnom putu mogu pridonijeti razvoju ove anomalije. Na primjer, disfunkcija Wnt7b može rezultirati nepravilnim razvojem medularne komponente bubrega, što može utjecati na migraciju i rotaciju bubrega tijekom razvoja, potencijalno dovodeći do fuzije donjih polova (85). Slično tome, poremećaji u ekspresiji Wnt9b i Wnt11 mogu utjecati na pravilno grananje ureteričkog pupoljka i formiranje metanefričkog mezenhima, što može rezultirati abnormalnostima u morfogenezi bubrega poput potkovičastog bubrega (142).

1.6. CAKUT kandidat geni kao medijatori Wnt kanonskog i nekanonskog puta

U okviru ovog istraživanja, poseban je fokus stavljen na analizu komponenata Wnt signalnog puta, te njihovih međusobnih interakcija između kanonskog i nekanonskog puta, koji imaju ključnu ulogu u razvoju bubrega i u ranom postnatalnom periodu, posebno u fazama grananja ureteričkog pupoljka i diferencijacije metanefričkog mezenhima. Analizirani su izražaji i distribucija proteina α -tubulin, inversin, DVL, Wnt5a/b i β -katenin s ciljem razumijevanja njihovog doprinosa nastanku razvojnih poremećaja poput hipoplazije, displazije, dvostrukog uretera i potkovičastog bubrega kod miševa i ljudi. Ovi markeri predstavljaju potencijalne molekularne indikatore patološke signalizacije unutar Wnt puta te bi njihovo dublje razumijevanje moglo pridonijeti razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih strategija za CAKUT.

1.6.1. α -tubulin

α -tubulin je ključna komponenta eukariotskog citoskeleta, koja zajedno s β -tubulinom tvori heterodimere i gradi mikrotubule. Gen koji kodira α -tubulin (TUBA1A) očuvan je kod svih eukariota i ima važnu ulogu u polimerizaciji mikrotubula, čime osigurava pravilnu

staničnu diobu, signalizaciju i strukturni integritet (143). Acetilacija α -tubulina, kao konzervirana posttranslacijska modifikacija, ključna je za stabilnost mikrotubula i funkciju primarnih cilija, čime osigurava intracelularni transport i pravilnu organizaciju stanice, što je od osobite važnosti za normalan razvoj bubrega (144, 145). α -tubulin ima važnu, ali indirektnu ulogu u Wnt signalnom putu tokom razvoja bubrega, pretežno kroz svoju ulogu u organizaciji mikrotubula i stabilnosti primarnih cilija koji su odgovorni za pravilan prijenos Wnt signala.

Primarne cilije su organele bazirane na mikrotubulima važne za homeostazu tkiva, gdje α -tubulin ima važnu ulogu u regulaciji unutarstaničnog transporta Wnt liganada, receptora i signalnih komponenti tijekom razvoja bubrega (146). Lokaliziran je na površinama parijetalnih epitelnih stanica Bowmanove kapsule, kao i u glomerulu, te proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima ljudskog bubrega. Istraživanje koje su proveli Manissorn i sur. pokazalo je da acetilacija α -tubulina potiče regeneraciju tkiva i smanjuje citotoksičnost u tubularnim stanicama bubrega izloženim stresu, naglašavajući njegovu zaštitnu ulogu u bubrežnom tkivu (147). Poremećaj acetilacije α -tubulina potiče epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) (148). Ovaj proces dovodi do smanjene stabilnosti mikrotubula, što rezultira pojavom fenotipova iz spektra CAKUT-a, gdje disfunkcija cilijarne signalizacije ometa epitelnu diferencijaciju i pravilno oblikovanje tkiva. Slični mehanizmi javljaju se i kod ciliopatija poput policistične bolesti bubrega (PKD).

Osim toga, inversin tvori stabilan kompleks s tubulinom u kulturama bubrežnih stanica. Studije pokazuju kako se α -tubulin, inversin i DVL-1 bili prisutni u strukturama bubrega, a svi su se kolokalizirali ne samo tijekom fetalnog razvoja bubrega, već i u bubrežnom tkivu djece stare 1,5 i 7 godina. Ovi nalazi su u skladu s aktivacijom Wnt signalnog puta, za koju je dokazano da se događa već tijekom tubulogeneze (149).

1.6.2. Inversin

Inversin (Inv) je protein od 1062 aminokiseline s 15 ankirinskih ponavljanja, prvi put otkriven kod mutiranih miševa koji su pokazivali obrnutu tjelesnu asimetriju, nerazvijene tubule i bubrežne ciste (150). Strukturno je sličan proteinu Diego iz *Drosophila*, koji stabilizira Fz/DVL kompleks na plazmatskoj membrani u Wnt signalizaciji (151). Pokazano je da Inv izravno veže DVL putem PDZ domene i stvara kompleks s njim, sugerirajući njegovu ulogu u inhibiciji kanonskog Wnt puta (Slika 6) (106). Osim toga, sudjeluje u nekanonskom Wnt/PCP putu interakcijama s proteinima Strabismus i Prickle, čime se potvrđuje njegova ključna uloga kao molekularnog prekidača između kanonske i nekanonske signalizacije (106). Inversin sam

po sebi ne regrutira Disheveled receptore na plazmatsku membranu, što otkriva važnost uzvodnih komponenti poput Frizzled receptora. Unatoč identificiranim interakcijama s različitim signalnim proteinima, precizan mehanizam djelovanja inversina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

U kontekstu razvoja bubrega u stanicama bubrežnog epitela, inversin se nalazi u primarnim cilijama, djelujući kao cilijarni protein (152), a in vitro se pokazalo da tvori stabilan kompleks s tubulinom (153). Čini se da inversin igra bitnu ulogu u ranoj morfogenezi pronefričkog sustava i određivanju lijevo-desne simetrije tijekom razvoja. Nužan je za dorzalno-ventralno pomicanje proksimalnog dijela pronefrosa, ali nije potreban za pomicanje u smjeru od stražnjeg prema prednjem dijelu koje potječe iz distalnog pronefrosa. Zanimljivo je da morfogogenetski pokreti stanica proksimalnog tubula prethode početku filtracije i potpuno funkcionalnom pronefričkom sustavu kod *Xenopusa*. Dakle, protok tekućine - koji u razvoju pronefrosa kod zebrice potiče kolektivnu migraciju stanica od distalnog prema proksimalnom dijelu očitito nije potreban za početno oblikovanje proksimalnog pronefrosa kod *Xenopusa*, ali može igrati ulogu u njegovom produljenju, izduživanju i diferencijaciji u kasnijim razvojnim fazama (154).

Na funkcionalnoj razini, mutacije cilijarnog proteina inversina dovodi do nefronoftize tipa II, autosomno recesivne bolesti bubrega karakterizirane brojnim bubrežnim cistama, situs viscerus inversus i bubrežnim zatajenjem (155). Postoji dovoljno dokaza koji ukazuju da Wnt signalizacija ne samo da regulira ciliogenezu, već da postoji i cilijarno posredovana inhibicija kanonskog Wnt puta putem regulacije DVL-1 i proteasoma (156, 157). Međusobna komunikacija između cilija i nekanonskog Wnt puta planarne polarizacije stanica određena je od strane PCP-a koji sudjeluje u orijentaciji cilija i u drugoj vrsti polariteta duž apikalno-bazalne osi, što rezultira vezivanjem bazalnog tijela i izlaskom cilija. Suprotno, dokazi o ulozi cilija u PCP-u dolaze iz otkrića da gubitak *Ifi20*, koji kodira intraflagelarni transportni protein-20, rezultira gubitkom cilija i uzrokuje pogrešno usmjeravanje stanične diobe i cističnu bolest bubrega kod miševa (158).

Mehanizam inhibicije još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no Simons i sur. predložili su da početak protoka kroz zrele nefrotske segmente potiče signalizaciju iz luminalnih cilija, koja može potisnuti kanonski Wnt put. Kada su stanice unutarnjeg medularnog sabirnog kanalića bile izložene laminarnom protoku u in vitro uvjetima, povećala se ekspresija cilijalnog proteina inversina, dok su citoplazmatske razine β -katenina pale (106). Nadalje, knockdown *Inv-a* u zebrici rezultira pojačanom ekspresijom kanonskih Wnt ciljeva i poremećajem

konvergentno-ekstenzijskih pokreta koji ovise o nekanonskom putu. U konačnici, u odsutnosti inversina dolazi do pojačane kanonske i oslabljene nekanonske signalizacije, što doprinosi nastanku cističnih lezija (106).

1.6.3. DVL

Dishevelled je citoplazmatski adaptorni protein i središnji regulator unutar Wnt signalizacijskog sustava, prisutan u obliku triju izoforma kod sisavaca (DVL1, DVL2, DVL3). Zahvaljujući svojim domenama (DIX, PDZ i DEP), DVL ima sposobnost usmjeravanja staničnog odgovora prema kanonskom ili nekanonskom Wnt putu. DIX domena primarno sudjeluje u aktivaciji kanonskog puta inhibiranjem kompleksa uništavanja β -katenina, dok DEP domena aktivira nekanonski Wnt put interakcijom s Daam1 i omogućuje premještanje DVL-a na plazmatsku membranu. PDZ domena povezuje DVL s Frizzled receptorima i sudjeluje u oba signalna puta (159).

Vezanje Wnt proteina na Fz receptore i LRP 5/6 dovodi do prijenosa dishevelled proteina na staničnu membranu, što uzrokuje fosforilaciju citoplazmatskih repova LRP 5/6. Fosforilirani LRP 5/6 tada može vezati Axin, uklanjajući ga iz destruktivnog kompleksa, čime dolazi do njegova rastavljanja i oslobađanja β -katenina (56). To rezultira stabilizacijom i nakupljanjem β -katenina u citoplazmi, a zatim njegovim prijenosom u jezgru gdje se veže s transkripcijskim faktorima TCF/Lef, što pokreće ekspresiju ciljanih gena važnih za rani razvoj bubrega, osobito tijekom mezenhimalno-epitelne tranzicije i proliferacije progenitorskih stanica (160). Naime, vezanje proteinskog kompleksa s DVL-om na membranski receptor nužan je korak za aktivaciju Wnt puta, dok isključivanje ključnih komponenti ovog signalnog mehanizma dovodi do rane perinatalne smrti zbog izostanka nefrogene zone u bubregu. DVL također sadrži signale za ulazak i izlazak iz jezgre (NLS i NES), a sve više dokaza upućuje na njegovu važnu ulogu u regulaciji transkripcije unutar jezgre. DVL može stvarati komplekse s β -kateninom i TCF-om, kao i s brojnim drugim transkripcijskim regulatorima poput FOXK1/2, TAZ, HIPK1 i EZH2 (161). Uloga se dodatno modulira posttranslacijskim modifikacijama poput fosforilacije, acetilacije i ubikvitinacije, čije se funkcionalne posljedice još uvijek istražuju.

U nekanonskom Wnt/PCP putu DVL sudjeluje u regulaciji planarne stanične polarizacije, migracije i pravilne orijentacije stanične diobe, što je ključno za morfogenezu i izduživanje nefronskih i sabirnih tubula. Vezanje Wnt liganda na Frizzled receptore dovodi do fosforilacije proteina Dishevelled, što omogućuje regrutaciju cilijarnog proteina inversina.

DVL potom sudjeluje u regulaciji aktinskog citoskeleta putem interakcije s proteinima poput Daam1, što utječe na oblik stanica i njihovo kretanje. Ova funkcija ključna je tijekom razvoja, npr. za konvergentno-produljujuće pokrete.

Tijekom embriogeneze, DVL ima ključnu ulogu u formiranju pronefrosa i segmentaciji nefrona. U odraslom bubregu DVL doprinosi očuvanju stanične arhitekture, polariteta i funkcionalnosti bubrežnog epitela. Neravnoteža u aktivnosti DVL-a, primjerice zbog mutacija ili cilijarnih poremećaja (npr. mutacija u inversinu), može rezultirati pretjeranom aktivacijom kanonskog puta, gubitkom nekanonskog signaliziranja, poremećajima ciliogeneze te razvojem cističnih i fibroznih promjena u bubregu (162). Time potkrepljuju činjenicu da se kanonski i nekanonski Wnt-signalni putevi, regulirani primarnim cilijama, te Dishevelled kao ključni posrednika, smatraju obveznim za normalan razvoj bubrega, a studije su pokazale značajno niže obojenje inversina i DVL-1 u multicističnoj displastičnoj bolesti bubrega u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom (155).

1.6.4. Wnt5a/b

Protein Wnt5a/b pripada skupini nekanonskih Wnt liganda i ima ključnu ulogu u regulaciji morfogeneze bubrega tijekom embrionalnog razvoja. Tijekom nefrogeneze, Wnt5a/b sudjeluje u kontroli stanične polarizacije, migracije i grananja ureteričkog pupoljka, čime doprinosi pravilnom oblikovanju bubrežnog tkiva. Njegova ekspresija je prostorno i vremenski regulirana te se smatra važnim regulatorom tubulogeneze i razvoja intersticija, osobito putem nekanonskog Wnt/Ca²⁺ i Wnt/PCP signalnog puta.

Član kinezinske obitelji, Kif26b, je nizvodni efektor Wnt5a-ROR puta, posredujući u migraciji stanica tijekom embrionalnog razvoja. Stoga je razvijen Wnt5a-ROR-Kif26b (WRK) reporterski test koji se može koristiti za mjerenje stupnja Wnt5a-ROR signalizacije u stvarnom vremenu, koristeći kombinaciju protočne citometrije, Western blota i mikroskopije s vremenskim prekidom (163).

U razvoju pronefrosa zebrice, Wnt5a se nalazi u pronefričnom glomerulu i igra ulogu putem nekanonskog Wnt signalnog puta u razvoju metanefričkog bubrega (164). Kod miševa, Wnt5a se može detektirati na posteriornom dijelu IM u stadiju E9.5, u cijelom području IM-a u E10.5, u epitelu Wolffovog kanala i ureteričkog pupoljka u E11.0, te u metanefrosu od E13.5 do E15.5. Miševi bez funkcionalnog Wnt5a ugibaju ubrzo nakon rođenja te pokazuju udvostručenje uretera, gubitak srži bubrega, agenezu bubrega i potkovičaste bubrege. Kod ovih miševa, razvoj ureteričkog stabla ozbiljno je poremećen zbog dezorganizacije bazalne

membrane. Nadalje, Wnt5a je ključan za razvoj sabirnih kanalića, koji potječu iz stabla ureteričkog pupoljka, putem mehanizama koji uključuju formaciju koštane srži (165). Kasnije su razvijeni i kondicionalni Wnt5a knockout modeli, koji pokazuju bilateralnu duplikaciju bubrega i uretera uslijed dvostrukog izrastanja UB-a. Kod tih mutanata, intermedijarni mezoderm je skraćen i proširen, što sugerira da Wnt5a ima ulogu u razvoju IM-a prije same formacije UB-a (139).

Oba receptora za Wnt5a/b, Ror1 i Ror2, prvenstveno su izraženi u mezenhimu između metanefričkog mezenhima i Wolffovog kanala, te su neophodni za izrastanje UB-a i proces grananja tijekom razvoja bubrega. Kod Ror1/Ror2 dvostrukih mutanata, formacija UB-a je nenormalna zbog gubitka MM-a. Ovi rezultati snažno upućuju na to da je Wnt5a/b ključan za poticanje grananja ureteričkog pupoljka i formiranje sabirnih kanalića.

1.6.5. β -katenin

β -katenin je protein koji se sastoji od 781 aminokiseline i sadrži 12 Armadillo (Arm) ponavljanja, koja zajedno tvore superhelikalnu strukturu sastavljenu od više α -heliksa i hidrofobne jezgre (166). Ova superheliksna konfiguracija stvara široki, pozitivno nabijeni žlijeb koji omogućuje interakcije β -katenina s različitim proteinima poput kadherina, TCF-a i APC-a. β -katenin je unutarstanična molekula uključena u staničnu adheziju, staničnu signalizaciju i regulaciju transkripcije gena. Otkriveno je da β -katenin ima dvije ključne funkcije. Prva se odnosi na njegovu ulogu u međustaničnoj adheziji, gdje se udružuje s α -kateninom i γ -kateninom kako bi povezo molekule stanične adhezije ovisne o kalciju s citoskeletnim strukturama (167). Zbog te povezanosti s E-kadherinom i citoskeletom, ova skupina proteina nazvana je kateninima. Druga važna funkcija β -katenina odnosi se na Wnt signalizaciju, što je utvrđeno proučavanjem njegovog homolognog proteina u *Drosophila* - Armadillo. Mutacije gena *wingless* u *Drosophila* dovele su do smanjenja razina Arm proteina i promjena u segmentalnom polaritetu embrija, čime je potvrđena povezanost između Wnt signalnog puta i β -katenina (168).

Tijekom normalnog razvoja bubrega, β -katenin se izražava u različitim staničnim populacijama uključujući epitel ureteričkih izdanaka, metanefrički mezenhim i bubrežnu stromu, gdje obavlja ključne regulatorne funkcije. U Wolffovom kanalu, β -katenin održava ekspresiju transkripcijskog faktora Gata3, neophodnog za proliferaciju i produžetak epitela kanala, a njegov gubitak dovodi do bubrežne ageneze (27). U ureteričkom epitelu, β -katenin direktno regulira Emx2 i njegove ciljne gene uključene u proces grananja, te održava identitet

stanica na vrhovima ureteričkih pupoljaka, što je ključno za pravilnu morfogenezu. U mezenhimalnim stanicama posreduje signalnu kaskadu koju pokreću Wnt9b i Wnt4, čime inducira program formiranja nefrona, omogućuje MET te održava populaciju progenitorskih stanica u suradnji sa Six2 (86). Važnost β -katenina u nefrogenezi potvrđena je istraživanjima na životinjskim modelima: miševi s mutacijom koja rezultira povećanom aktivnošću β -katenina pokazuju letalnost unutar 24 sata nakon rođenja, s izraženim poremećajima u epitelnom grananju i izostankom tubulogeneze. Suprotno tome, uklanjanje β -katenina iz kondenziranog mezenhima dovodi do smanjene ekspresije ciljnih gena i značajnog pada broja nefrogenskih progenitora (89). U stromi bubrega, β -katenin ima različite uloge ovisno o lokalizaciji: u kapsuli bubrega potiče stanične adhezije, u kortikalnoj stromi posredno regulira formiranje nefrona putem Wnt9b signalizacije, dok u medularnoj stromi sudjeluje u oblikovanju kortiko-medularne osi i regulaciji elongacije tubula. Gubitak β -katenina u ovim stromalnim populacijama dovodi do niza strukturnih i funkcionalnih defekata, potvrđujući njegovu središnju ulogu u razvoju bubrega (135).

Na molekularnoj razini, β -katenin djeluje kroz TCF/Lef ovisne i neovisne puteve kako bi potaknuo diferencijaciju nefrogenskih matičnih stanica preko regulacije Fgf8 i Wnt4, što omogućuje izlazak iz staničnog ciklusa i ulazak u program diferencijacije. Ipak, produljena aktivacija β -katenina pokazala se štetnom jer blokira MET, što ukazuje na potrebu za njegovom preciznom vremenskom regulacijom tijekom razvoja nefrona (169). Tijekom napredovanja razvoja metanefričkog bubrega, aktivnost β -katenina postaje sve više lokalizirana na vrhove ureteričkih ogranaka. Eksperimentalni modeli potvrđuju ovu dinamiku: miševi s eksperimentalno induciranom prekomjernom ekspresijom β -katenina u ureteričkom epitelu pokazuju ozbiljne poremećaje u grananju i formiranju nefrona (90).

Wnt β -katenin signalni put, iako je u zdravim organima odraslih uglavnom neaktivan, ponovno se aktivira u kontekstu bubrežnih ozljeda kod životinjskih modela i ljudskih bolesti bubrega, pri čemu može djelovati dvosmjerno - pružajući zaštitu, ali istovremeno potencijalno pridonoseći oštećenju.

1.7. Yotari miševi (*Dab1*^{-/-}) kao model za istraživanje Wnt signalizacije u razvoju bubrega

Primjena modelnih organizama u biomedicinskim istraživanjima temeljna je metoda za razumijevanje složenih bioloških procesa i bolesti kod čovjeka. Posebno mjesto u tom kontekstu zauzima miš, čiji su razvojni, anatomske i fiziološki mehanizmi visoko konzervirani

u odnosu na ljudske. Upravo ta evolucijska sličnost omogućuje prijenos spoznaja iz istraživanja na mišjim modelima na razumijevanje patogeneze bolesti kod ljudi. Genomska sličnost između miša i čovjeka dodatno podupire njihovu upotrebu u istraživanjima. Približno 95 % gena zajedničko je objema vrstama, a 80 % mišjih gena ima ljudske ortologe. Sekvenciranjem genoma obje vrste otvorena su vrata preciznoj analizi strukture i funkcije gena, što je od posebnog značaja za proučavanje kongenitalnih razvojnih poremećaja (170).

Korištenje genetičkih tehnika za manipulaciju genima u miševima omogućava istraživanje njihove normalne funkcije i uloge u bolestima. Manipulacijom gena, uključujući metode poput knockout modela, može se „utišati” (ukloniti, deaktivirati) specifičan gen u određenom vremenskom periodu ili u odabranim tkivima i proučavati nastale fenotipske promjene (171). Ovi modeli su ključni za razumijevanje razvoja genetičkih bolesti, a njihovi rezultati mogu se primijeniti na ljudski organizam (172). Postupak izrade knockout životinja složen je i obuhvaća nekoliko faza: izrada vektora s ciljanom mutacijom, unošenje vektora u embrionalne matične stanice, odabir stanica koje su prošle homolognu rekombinaciju, stvaranje himernih miševa te razmnožavanje za proizvodnju homozigotnih transgeničnih životinja (173).

Homoziotni (*Dab1*^{-/-}) *yotari* mutirani miševi, karakterizirani autosomnom recesivnom mutacijom *Dab1* gena, izražavaju fenotip sličan reeler fenotipu, koji uključuje nespretn hod, drhtanje i prijevremenu smrt, uz histološke abnormalnosti središnjeg živčanog sustava; te prirodene anomalije bubrega i mokraćnog sustava koje rezultiraju bubrežnom hipoplazijom i gubitkom funkcionalnog bubrežnog tkiva *yotari* miševa (174).

Disabled 1 (*Dab1*) je otkriven kod miševa kao intracelularni adaptorni protein koji ima ključnu funkciju u signalnom prijenosnom putu uključenom u formiranje neuronskih mreža i pozicioniranje neurona u razvoju mozga, te kanonskom reelin/*Dab1* putu koji igra ključne uloge u odlukama o sudbini stanica i diferencijaciji tijekom razvoja bubrega (175). Za našu studiju, knockout *Dab1* gena u *yotari* miševima postignut je korištenjem fosfoglicerat-kinaza-1 (PGK) promotora, koji kontrolira izražavanje gena za neomicin fosfotransferazu. Ovaj promotor omogućuje selekciju stanica koje su integrirale gen za neomicin, čineći ih otpornim na toksin difterije, čime su eliminirane stanice koje nisu prošle homolognu rekombinaciju. PGK-neo kazeta često je kombinirana s LoxP sustavom, što omogućuje naknadno izrezivanje vektora pomoću Cre rekombinaze (CRE) (176).

Yotari miševi (*Dab1*^{-/-}) predstavljaju vrijedan model za istraživanje poremećaja u Wnt signalizaciji. Bubrezi *yotari* miševa pokazuju smanjenu organizaciju nefrona, s prisutnošću

cisti u bubrežnom korteksu i meduli, što je povezano s poremećenom polarizacijom tubularnih stanica. Ova promjena nastaje zbog smanjenje ekspresije DVL2, β -katenina i Wnt4, što ukazuje na disregulaciju Wnt signalizacije. Uzimajući u obzir da je Dab1 negativni regulator kanonske Wnt signalizacije, njegov gubitak u *yotari* miševima uzrokuje disfunkciju u normalnoj proliferaciji i diferencijaciji tubularnih stanica, što dovodi do fenotipa nalik nefrocističnim bolestima i hipoplaziji bubrega. Ovaj mehanizam je važan za razumijevanje patogeneze CAKUT-a i drugih cističnih bubrežnih bolesti.

1.8. Dijagnostika i liječenje CAKUTa

Većina slučajeva CAKUT-a dijagnosticira se prenatalnim ultrazvukom, kojim se procjenjuju bubrezi, izvodni mokraćni putevi te, što je posebno važno, volumen amnionske tekućine. Nakon 18. tjedna gestacije, amnionska tekućina sastoji se pretežito od urina koji stvaraju fetalni bubrezi (177).

Ultrazvuk tijekom trudnoće točno identificira CAKUT u 60-85 % slučajeva, osobito kada se pregled provodi u trećem tromjesečju (178). Preostali slučajevi najčešće se otkrivaju nakon rođenja, kada dijete razvije simptome poput infekcije mokraćnog sustava, što potiče daljnju obradu uključujući ultrazvuk i druge slikovne metode za procjenu bubrežne anatomije i izvodnih puteva.

Djeca rođena s jednim ili s dva bubrega, ali sa smanjenim brojem nefrona, često su klinički asimptomatska sve do adolescencije ili odrasle dobi, kada se može razviti rana hipertenzija i/ili CKD.

Na temelju sonografskih mjerenja, bubrezi koji su smanjeni po dužini, ali bez drugih abnormalnosti, klasificiraju se kao hipoplastični, dok su bubrezi koji su mali, hiperehogeni i s/bez cisti opisani kao displastični. Iako se pojmovi hipoplazija i displazija tehnički odnose na histološki nalaz, bubrežna biopsija se rijetko provodi kod ovih bolesnika zbog malih dimenzija bubrega i/ili prisutnosti dilatiranog uretera, što povećava rizik od komplikacija.

Ukratko, ultrazvuk i druge slikovne metode, uključujući mikcijsku cistouretrografiju i scintigrafiju iz nuklearne medicine, temeljne su dijagnostičke metode za utvrđivanje lokalizacije, morfologije bubrega te eventualnih opstrukcija ili dilatacija izvodnih mokraćnih puteva. Genski paneli se temelje na NGS tehnologiji (masivno paralelno sekvenciranje) koja pruža novi način utvrđivanja slijeda razvoja poremećaja na molekularnoj razini, čime se poboljšava procjena rizika za razvoj poremećaja iz domene CAKUT-a. Cjelogenomsko sekvenciranje (WES) pruža značajne prednosti u dijagnostici i upravljanju bolesnicima s

CAKUT-om koji su dijagnosticirani prije treće godine života, osobito kod pacijenata kojima je potrebna nadomjesna bubrežna terapija ili koji imaju ekstrarenalne anomalije (179).

Nakon što se CAKUT identificira slikovno, sljedeći korak je procjena bubrežne funkcije putem serumske razine kreatinina, kojom se može odrediti veličina deficita nefrona. Ovaj deficit može biti posljedica razvojne anomalije, dodatno pogoršane infekcijama i/ili povećanim intrarenalnim tlakom uslijed opstrukcije izvodnih puteva (180).

Liječenje CAKUT-a zahtijeva individualiziran pristup koji uključuje prenatalnu dijagnostiku, konzervativno liječenje, kirurške intervencije i, u težim slučajevima, nadomjesnu bubrežnu terapiju. Blaži oblici, poput blage hidronefroze, često se samo prate redovitim ultrazvučnim kontrolama, dok se kod povećanog rizika od infekcija može uvesti profilaktička antibiotska terapija (181). Teži oblici, poput opstrukcija ureteropelvičnog spoja ili stražnjih uretralnih valvula, obično zahtijevaju kirurško liječenje radi osiguravanja normalnog otjecanja urina i očuvanja bubrežne funkcije. U odabranim slučajevima mogu se razmotriti i prenatalne intervencije poput postavljanja šanta, iako je njihova dugoročna učinkovitost još uvijek predmet znanstvenih rasprava (182). Djeca s teškim oblicima CAKUT-a koji progrediraju u završni stadij kronične bubrežne bolesti liječe se peritonejskom dijalizom i/ili transplantacijom bubrega, pri čemu se u određenim slučajevima prethodno izvodi augmentacija mokraćnog mjehura radi stvaranja adekvatnog drenažnog puta za transplantirani bubreg (183). Djeca s jednostranom agenezom ili hipoplazijom često imaju očuvanu funkciju zahvaljujući kompenzaciji zdravog bubrega, no u prisutnosti dodatnih anomalija povećava se rizik od hipertenzije, proteinurije i progresije u CKD. U takvim slučajevima primjenjuju se ACE inhibitori radi očuvanja bubrežne funkcije, a u terminalnoj fazi bolesti potrebna je dijaliza ili transplantacija (184). Upravljanje CAKUT-om nužno zahtijeva multidisciplinarni pristup, s posebnim naglaskom na rast i razvoj djeteta, kontrolu krvnog tlaka, ravnotežu elektrolita i prevenciju komplikacija poput anemije i mineralno-koštanih poremećaja.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je analizirati utjecaj funkcionalnog utišavanja gena *Dab1* na izražaj i lokalizaciju proteina α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u razvojnim i postnatalnim bubrezima miševa bez *Dab1* gena (*yotari* ili *Dab1*^{-/-}). Naša studija će istražiti slične fenotipske izražaje i posljedice inaktivacije *Dab1* u bubrežnom tkivu kako bismo razumjeli utječe li nedostatak aktivnosti gena *Dab1* na izmjene u kanonskom i nekanonskom Wnt signalnom put.

S obzirom na to da su temeljni podaci našeg trenutnog znanja o izražaju i povezanosti kandidat gena u CAKUT bubrežnom tkivu dobiveni iz studija na *knockout* miševima, koristit ćemo imunofluorescencijske biljege kako bismo analizirali prostorno-vremenski obrazac izražaja α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina - kandidat gena za CAKUT tijekom normalnog razvoja ljudskih bubrega (CTRL) i razvoja bubrega zahvaćenih CAKUT-om (HYP, DYS, UD, HK) u razdoblju od 18. do 38. tjedna fetalnog razvoja kako bismo utvrdili eventualne promjene u izražaju gena i proteina povezane s pojavom CAKUT-a.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Identificirati i kvantificirati prostorni i vremenski izražaj bjelančevina α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin u različitim dijelovima bubrega miševa bez gena *Dab1* (*yotari* ili *Dab1*^{-/-}) i kontrolnih miševa u gestacijskim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5), te u postnatalnim danima 4 (P4) i 14 (P14), koristeći tehniku indirektno imunofluorescencije.
2. Utvrditi i kvantificirati prostorni i vremenski izražaj bjelančevina α -tubulin, inversin, DVL-1 i β -katenin u različitim fazama razvoja bubrega (CTRL) te u razvoju bubrega s kongenitalnim anomalijama (HYP, DYS, UD, HK) od 18. do 38. tjedna fetalnog razvoja, primjenjujući indirektnu imunofluorescenciju.
3. Potvrditi prisutnost ili odsutnost ko-ekspresije α -tubulin, inversin i DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin u različitim strukturama zdravih bubrega i *Dab1*^{-/-} (*yotari*) miševa, te kod ljudi u razvojnim stadijima zdravog bubrega (CTRL) i razvoju bubrega s CAKUT-om (HYP, DYS, UD, HK) korištenjem dvostrukog imunofluorescentnog bojenja.
4. Analizirati razlike u prostornom i vremenskom izražaju α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin gena između ljudi i miševa u odgovarajućim stadijima korištenjem imunofluorescencije.

5. Razmotriti potencijalne buduće terapijske opcije za navedena patološka stanja.

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Izražaj α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina tijekom fetalnog razvoja bubrega miša i čovjeka ukazuje na njihovu ulogu u uspostavi i održavanju pravilne građe i funkcije bubrega.
2. Promijenjeni izražaj α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina tijekom fetalnog razvoja bubrega miša i čovjeka može dovesti do poremećaja u izmjeni između kanonskog i nekanonskog Wnt puta i razvoja prirođenih anomalija bubrega i urotrakta (CAKUT).

3. MATERIJALI I METODE

U ovom su dijelu disertacije detaljno prikazani svi materijali i eksperimentalni postupci korišteni tijekom istraživanja, s ciljem osiguravanja točnosti, ponovljivosti i znanstvene validnosti rezultata. Opisana je priprema i obrada uzoraka bubrega dobivenih iz ljudskih i mišjih izvora, uključujući metode prikupljanja, fiksacije, uklapanja i pohrane biološkog materijala. Poseban naglasak je na histološkim i imunohistokemijskim tehnikama korištenim za analizu morfoloških i molekularnih promjena u bubrežnom tkivu. Protokoli bojanja hematoksilinom i eozinom (HE) korišteni su za uvid u opću histološku strukturu i prepoznavanje potencijalnih patoloških promjena, dok su tehnike imunofluorescence primijenjene za detekciju specifičnih proteina povezanih s Wnt signalnim putem i razvojnim anomalijama bubrega. Detaljno su opisani i korišteni protutijela, uvjeti inkubacije te metode vizualizacije i kvantifikacije fluorescentnih signala. Uz to, navedene su metode statističke obrade podataka, korišteni softverski alati te pristupi interpretaciji dobivenih rezultata. Cilj ovog poglavlja jest pružiti sveobuhvatan pregled eksperimentalnog dizajna kako bi se osigurala transparentnost i omogućila potencijalna buduća istraživanja.

3.1. Etička dozvola

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i Kliničkog bolničkog centra Split odobrilo je provođenje istraživanja (broj dozvole: 2181-198-03-04-16-0024). Temeljni etički i bioetički principi (osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost) su poštovani prilikom provođenja istraživanja u skladu s Nirnberškim kodeksom, Helsinškom deklaracijom (World Medical Association Declaration of Helsinki - 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013) i njenim dopunama. Podaci prikupljeni u studiji koristiti će se isključivo u znanstveno-istraživačke svrhe. Doktorska disertacija je izrađena u sklopu projekata Hrvatske zaklade za znanost: „Karakterizacija kandidat gena za prirođene anomalije bubrega i urotrakta tijekom razvoja u miša i čovjeka” i „Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava (NEPHROGEN)” voditeljice prof. dr. sc. Katarine Vukojević.

3.2. Prikupljanje animalnih uzoraka

DABI heterozigotne životinje, koje su generirane od strane *Jackson Laboratories*, su uzgojene do homozigotnosti. C57BL/6N miševi su uzgojeni u standardnim polikarbonatnim kavezima s neograničenim pristupom hrani i vodi, održavajući 12-satni ciklus noć/dan pri temperaturi od 23±2°C. U svakom kavezu je uzgajana najmanje jedna životinja svakog

genotipa: divlji tip, heterozigotni tip i *Dabl*^{-/-} (*yotari*) tip pokusnih životinja. Svaka ispitivana skupina je obuhvatila 3 do 7 životinja po genotipu.

Gravidne miševе su žrtvovane 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) gestacijskog dana, pri čemu su embriji pohranjeni. Miševi su 4. i 14. postnatalnog dana, duboko anestetizirani, transkardijalno perfundirani PBS-om i 4% paraformaldehidom u 0.1 M PBS-u. Nakon izdvajanja, bubrezi i embriji su fiksirani u 4% paraformaldehidu u 0.1 M PBS-u preko noći. DNA uzorak potreban za PCR genotipizaciju je izoliran iz tkiva repa životinja prema uputama protokola Qiagen kompleta. Ovime će se odrediti genotipovi eksperimentalnih životinja. Za PCR analizu koristit će se sljedeće početnice:

yotari - GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CAGTGAGTACATATTGTGTGAGTTCC;

divlji tip - GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CCTTGTTTCTTTGCTTTAAGGCTGT.

3.2.1. Izračun veličine uzorka

Veličina uzorka je određena pomoću Meadove jednadžbe resursa (često se koristi za procjenu veličine uzorka laboratorijskih životinja, kao i u mnogim drugim laboratorijskim pokusima) (185).

$$E=N-B-T$$

$$E+B+T=N$$

$$20 + 4 + 1 = 25 \rightarrow 12 \text{ wt} + 12 \text{ yot}$$

N je ukupan broj pojedinaca ili jedinica u studiji (minus 1).

B je blokirajuća komponenta, koja predstavlja utjecaje na okoliš dopuštene u dizajnu (minus 1) – 5 stadija razvoja (E13.5, E15.5, P4, P14) -1 = 4

T je komponenta liječenja, koja odgovara broju tretiranih skupina (uključujući kontrolnu skupinu) koje se koriste ili broju postavljenih pitanja (minus 1) wt i yot – 2 -1 = 1

E je stupanj slobode komponente pogreške i trebao bi biti negdje između 10 i 20 – (20)

Prema navedenoj jednadžbi, korištene su 3 životinje po pojedinom razvojnem stadiju divljeg tipa i *yotari* miša. U našem istraživanju svaka ispitivana skupina je sadržavala 3 do 7 životinja od svakog genotipa.

3.3. Prikupljanje humanih uzoraka

Zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split prikupio je 31 parafinski blok fetalnog bubrežnog tkiva (Tablica 3). Uzorci su prikupljeni nakon spontanih i eugeničkih pobačaja zbog teških abnormalnosti fetusa, a obrada uzoraka

odobrena je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (klasa: 003-08/16-03/0001, broj odobrenja: 2181-198-03-04-16-0024) u skladu s načelima Helsinške deklaracije (186). Analiza uzoraka je provedena standardnim histološkim tehnikama i svjetlosnom mikroskopijom kako bi se isključili svi macerirani uzorci tkiva. Za procjenu gestacijske dobi fetusa korištene su vrijednosti vanjske duljine (udaljenost tjeme - trtica) i informacije o posljednjoj menstruaciji majke (187). Patologija bubrega je klasificirana temeljem grube morfologije i rutinske histopatologije. Unatoč iznimnoj vrijednosti i ograničenom broju uzoraka, ova arhivska zbirka ima neizmjeran značaj.

Tablica 3. Uzorci ljudskih fetalnih bubrega (n = 31) analizirani u studiji.

Razvojni tjedan	Broj uzoraka bubrega	Bubrežna patologija
18	5	Normalni bubrezi (CTRL)
22	1	
24	1	
27	4	
29-30	2	
35	1	
37	1	
38	1	
22	1	Potkovičasti bubrezi (HK)
27	1	
30	1	
35	1	
22	1	Displastični bubrezi (DYS)
27	1	
35	1	
37	1	
38	1	
24	2	Bubrezi s dvostrukim ureterom (UD)
30	1	
38	1	

22	1	Hipoplastični bubrezi
38	1	(HYP)

3.3.1. Izračun veličine uzorka

Veličina uzorka je određena pomoću gore navedene Meadove jednadžbe resursa:

$$(E+B+T=N)$$

Parametri za ovu analizu su određeni kako slijedi:

$$10 + 7 + 3 = 20 + 1 = 21 \text{ uzoraka}$$

N je ukupan broj pojedinaca ili jedinica u studiji (manje 1).

B je blokirajuća komponenta (manje 1) – 8 ispitivanih razvojnih tjedana (18., 22., 24., 27., 30., 35., 37., 38.) -1 = 7

T je komponenta liječenja, koja odgovara broju tretiranih skupina (uključujući kontrolnu skupinu) koje se koriste ili broju postavljenih pitanja (manje 1) UD, HYP, DYS, CTRL – 4 -1 = 3

E je stupanj slobode komponente pogreške i trebao bi biti negdje između 10 i 20 – (10)

Prema tome, potreban broj uzoraka iznosi $N + 1 = 21$. Budući da je u istraživanju analiziran 31 uzorak, može se zaključiti da je veličina uzorka statistički više nego dostatna za dobivanje pouzdanih rezultata. Svaka ispitivana skupina sadržavala je minimalan broj od 3 uzorka iz čega slijedi da je uzorak dovoljan.

3.4. Histološka analiza

3.4.1. Priprema bubrežnog tkiva za histološku analizu

Nakon fiksacije u 4% otopini paraformaldehida (PFA) u 0.1 M PBS tijekom noći, slijedi dehidriranje u uzlaznoj seriji otopina etanola (25%, 50%, 75%, 96%, 100%) i ksilena te uklapanje u parafinske blokove. Rezovi debljine 5 μm su dobiveni mikrotomom i zalijepljeni na predmetna stakalca. Prije histološke analize, uzorci su deparafinirani u ksilenima, rehidrirani u silaznoj seriji otopina etanola (100%, 96%, 70%) i isprani u vodi.

3.4.2. Hematoksilin-eozin bojanje

Bojenje hematoksilin-eozinom (HE) je provedeno kao osnovna histološka metoda, gdje hematoksilin boji jezgru plavom bojom, a eozin različitim nijansama crvene boje boji

citoplazmu, eritrocite, mišićno i vezivno tkivo. Nakon deparafiniranja i rehidriranja uzorci su inkubirani u otopini Meyerova hematoksilina u trajanju od 10 minuta, te ispirani u običnoj mlakoj vodi. Potom su prebačeni u otopinu eozina na par minuta (5 minuta), dehidrirani serijom rastućih etanola i ksilenom, ukapljeni u Canada balzam, prekriveni pokrovnim stakalcem, te proučavani svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX40, Tokyo, Japan) kako bi se potvrdila prethodno postavljena dijagnoza i procijenila očuvanost tkiva prije imunofluorescentnog bojanja.

3.4.3. Imunofluorescentno bojanje

Za imunofluorescentno bojenje, uzorci su prošli postupak deparafinizacije, rehidracije, kuhanja u citratnom puferu (pH=6.2) 30 minuta radi otkrivanja antigena. Potom slijedi hlađenje na sobnoj temperaturi, ispiranje s radnim PBS-om, odvajaju PAP penom, te 20 minuta inkubiranja s Protein-blok otopinom. Uzorci se zatim inkubiraju u vlažnoj komori preko noći s primarnim protutijelima (Tablica 4). Nakon ispiranja PBS-om nanose se sekundarna protutijela (Tablica 4) te inkubiraju u vlažnoj komori, u mraku, jedan sat. Nakon ispiranja PBS-om, nanosi se DAPI, bojilo za jezgre jednu minutu te se uzorci uklapaju u Immu-mount medij i prekrivaju pokrovnim stakalcem. Negativna kontrola dobivena je izuzimanjem primarnog protutijela tijekom imunohistokemijskog bojenja.

Tablica 4. Primarna i sekundarna protutijela korištena u indirektnoj imunoflorescenciji.

	Protutijelo/kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna protutijela	Anti-Acetyl-A-Tub/12152S	miš	1:500	Cell Signaling Technology (CST), (Danvers MA, USA)
	Anti-Inversin/ab65187	kunić	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-DVL1/sc8025	miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
	Anti-Wnt5a/2530S	kunić	1:100	Cell Signaling

				Technology (CST), (Danvers MA, USA)
	Anti- β -katenin/2677S	miš	1:200	Cell Signaling Technology (CST), (Danvers MA, USA)
Sekundarna proutijela	Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488, 711-545-152	magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, USA)
	Anti-Mouse IgG, Rhodamine Red™-X, 715-295-151	magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, USA)

3.5. Prikupljanje podataka i obrada mikrofotografija

Za analizu podataka i mikrofotografija su uzorci bubrega *Dab1*^{-/-} (*yotari*) i kontrolnih miševa E13.5 i E15.5 te P4 i P14 te humanih fetalnih bubrega u razvoju i fetalnih bubrega zahvaćenih CAKUT-om pregledavani na fluorescencijskom mikroskopu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) i slikani na objektivu povećanja $\times 40$ digitalnom kamerom (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Kako bi kvantificirali imunoekspresiju proteina od interesa, deset nepreklapajućih vidnih polja bubrežne kore su snimljena pri povećanju $\times 40$, s konstantnim vremenom ekspozicije. Snimili smo najmanje deset slika embrionalnih bubrežnih struktura: metanefrogenog mezoderma (MM), bubrežnih mjehurića/nezrelih glomerula (Rv/G), ampula/sabirnih kanalića (A/Cd) i zavijenih kanalića (Ct) u E13.5 i E15.5, i najmanje dvadeset postnatalnih bubrežnih struktura: glomerula (G), proksimalnih (pct) i distalnih zavijenih kanalića (dct) u P4 i P14.

Mikrofotografije mišjih uzoraka su obrađene i preklopljene korištenjem Adobe Photoshop softvera (Adobe, San Jose, CA, USA) te analizirane pomoću ImageJ softvera (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Brojali smo pozitivne acetil α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin imunoreaktivne stanice u svakoj strukturi od interesa, izrazito kao postotak i uprosječen po životinjskoj skupini. Bilo koja razina citoplazmatskog,

jezgrenog ili membranskog bojenja je smatrana pozitivnom. Kvalitativna analiza intenziteta bojanja je određena semikvantitativno i organizirana u četiri grupe: odsutnost bojanja (-), blago bojanje (+), umjereno bojanje (++) te jako bojanje (+++).

Mikrofotografije humanih uzoraka su obrađene pomoću ImageJ softver u svrhu kvantitativne procjene imunoreaktivnosti stanica. Prvo, curenje fluorescencije je smanjeno oduzimanjem crvene pozadine od zelenog fluorescencijskog signala korištenjem ranije navedenih naredbi „*split channels*” te „*image calculator*”, a zatim će se koristiti srednji filter s polumjerom od 2,0 piksela. Svaka slika je naknadno podešena metodom granične vrijednosti („*triangle*”), a područje postotka fluorescencije izmjereno korištenjem opcije „*analyze particles*”. S obzirom na varijacije među ispitivačima, tri će stručna histologa su neovisno analizirala snimljene mikrofotografije, postavljajući pozadinske granične vrijednosti pomoću negativnih kontrolnih slika.

Slaganje ocjenjivača dokazano je analizom međurazredne korelacije, koji je dao koeficijent > 0.8 , što ukazuje na izvrsno podudaranje. Slike su sastavljene pomoću softvera Adobe Photoshop. Mikrofotografije su za potrebe prezentacije obrađene oduzimanjem pozadine pomoću naredbi „*split channels*” te „*image calculator*” u svrhu minimaliziranja curenja fluorescentnog signala iz crvenog u zeleni filter te „*brightness*” i „*contrast*”.

3.6. Statistički postupci

Za analizu mišjih uzoraka dobivenih obradom mikrofotografija uzoraka bubrega *Dab1*^{-/-} (*yotari*) i kontrolnih miševa razvojnih stadija E13.5, E15.5, P4 i P14, korišten je statistički program GraphPad Prism 9.0.0 softver (Softver GraphPad, San Diego, CA, SAD). Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$, a svi intervali pouzdanosti (CI) na razini od 95%. Kvantitativna analiza mišjih uzoraka je provedena s dvosmjernim ANOVA s Tukeyjevim testom višestruke usporedbe, pri čemu se rezultati prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

Za provjeru normalne distribucije podataka dobivenih istraživanjem ljudskih uzoraka primijenjen je Shapiro-Wilkov test. Svaki skup podataka koji se odnosi na analizu postotka površine opisan je s p na razini vjerojatnosti od $p < 0,05$, što se smatra statistički značajnim, uz korištenje F distribucije, $F (DFn, Dfd)$, gdje DFn označava brojnik stupnjeva slobode, a Dfd nazivnik stupnjeva slobode. Postotak pozitivnih stanica je izražen kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

GraphPad softver korišten je i za statističku analizu podataka dobivenih obradom mikrofotografija kore kontrolnih humanih fetalnih bubrega u razvoju i fetalnih bubrega zahvaćenih CAKUT-om. Za proučavanje dinamike ekspresije proučavanih proteina kroz razvojna razdoblja koristilo se linearno i nelinearno regresijsko modeliranje. Koeficijent u modelima koji se koriste za opis trenda prikazan je kao procijenjena točka $\pm$ standardna pogreška. Koeficijent determinacije (R^2) korišten je kao procjena valjanosti podudaranja podataka s regresijskim modelom. Linearni trend opisan je korištenjem nagiba pravca linearne regresije (β). U analizi vremenskog i prostornog izražaja α -tubulin, inversin, DVL-1 i β -katenin bjelančevina tijekom razvoja zdravih fetalnih bubrega čovjeka i fetalnih bubrega zahvaćenih CAKUT-om, glavna mjera ishoda je postotak površine pokrivene signalom. Jednosmjerna ANOVA s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi koristila se za određivanje razlike značajnosti u izražaju promatranih proteina između uzoraka bubrega različitih CAKUT fenotipova i CTRL. Statistički značajnom je smatrana razlika pri $p < 0.05$. Svi grafovi su izrađeni pomoću GraphPad Prism 9.0.0.

4. REZULTATI

U prvom dijelu predstavljani su rezultati dvostrukog imunofluorescencijskog bojenja kojima je analizirana prostorna i vremenska ekspresija proteina acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa te *yotari* (*Dab1*^{-/-}) miševa, koji predstavljaju eksperimentalni model za ispitivanje molekularnih mehanizama prirodnih anomalija bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT). Svrha ovog dijela istraživanja bila je analizom ekspresijskih obrazaca ključnih proteina u normalnim i patološkim uzorcima utvrditi moguće molekularne mehanizme koji doprinose poremećajima u Wnt signalizaciji i staničnoj diferencijaciji tijekom razvoja bubrega u miša.

4.1. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin proteina u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Za analizu obrazaca ekspresije proteina korišteni su bubrezi miševa *yotari* (*yot*) *Dab1*^{-/-} i divljeg tipa (wt), pri čemu su praćeni markeri acetilirani α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin u glomerulima (G), proksimalnim (pct) i distalnim zavijenim kanalićima (dct) u postnatalnim danima P4 i P14. Embrionalne strukture, uključujući bubrežne mjehuriće/nezrele glomerule (Rv/G), ampule/sabirne kanaliće (A/Cd), zavijene kanaliće (Ct) i metanefrogeni mezenhim (MM), analizirane su pomoću miševa u gestacijskim danima E13.5 i E15.5. Poseban naglasak stavljen je na koekspresiju inversina s DVL-1 te Wnt5a/b s β -kateninom. Dobiveni markeri pokazali su pozitivne obrasce ekspresije, ali s razlikama u intenzitetu (semikvantitativna analiza prikazana u Tablici 5), distribuciji i količini.

Tablica 5. Intenzitet bojenja specifičnim protutijelima u bubrezima *yotari* i divljih miševa u embrionalnim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5).

Embrionalni dan (E)	Životinja	Struktura	Protutijelo				
			α -Tubulin	Inversin	DVL-1	Wnt5a/b	β -catenin
E13.5	divlji tip	Rv/G	-	++	+	+	+
		A/Cd	++	-	-/+	+	+++
		Ct	-/+	-	-/+	-	+
		MM	+	++	+	++	++
	<i>yotari</i>	Rv/G	-	++	+	+	+
		A/Cd	+++	+	-/+	-	+++
		Ct	+	-/+	-/+	-	+++

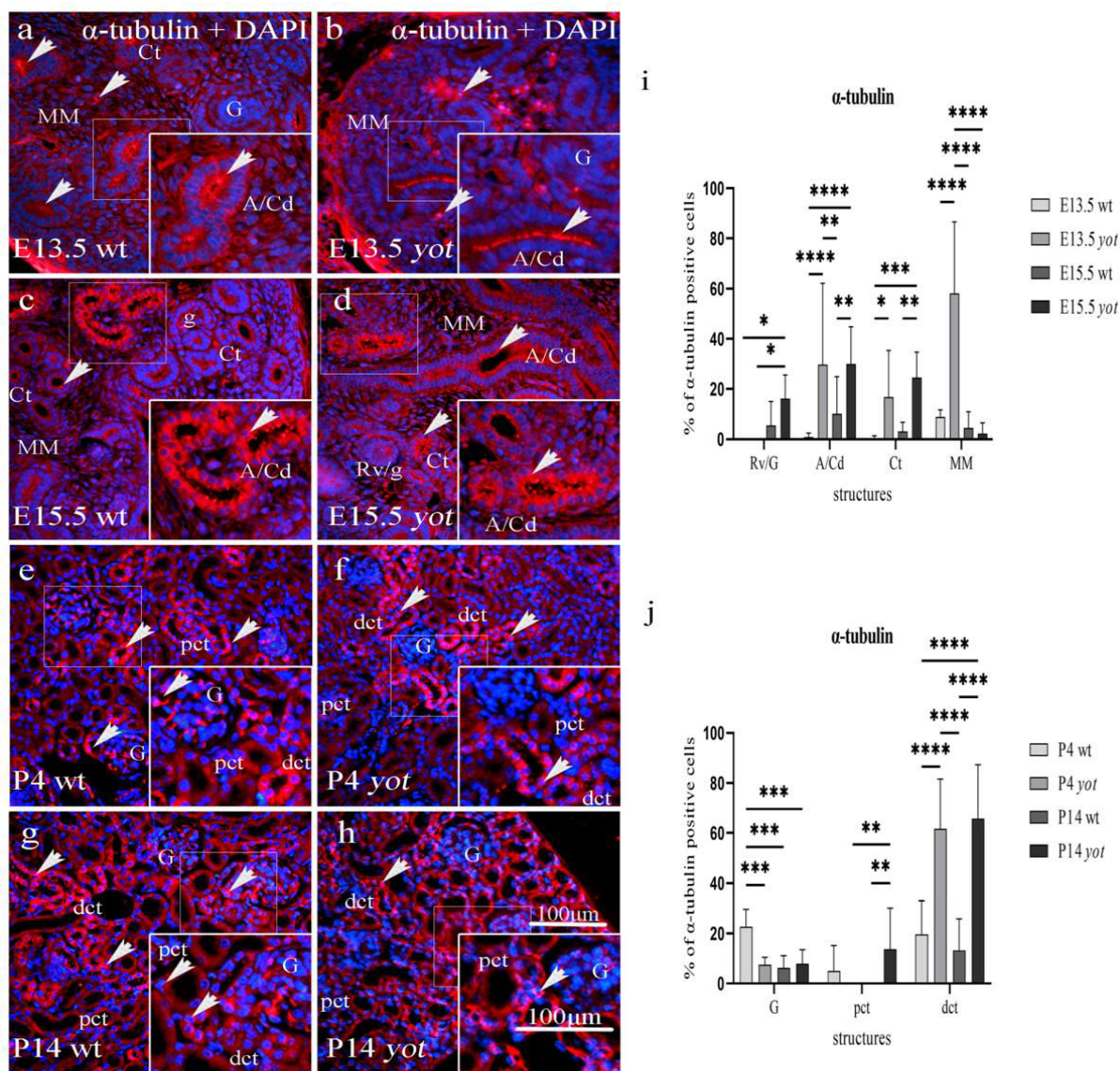
E15.5	divlji tip	MM	++	+++	++	++	++
		Rv/G	-/+	++	++	+	-/+
		A/Cd	+++	-/+	-/+	-	++
		Ct	+	+	-	++	++
		MM	+	+++	+	+	+
	<i>yotari</i>	Rv/G	+	++	++	+	-
		A/Cd	+++	-	+	+	+++
		Ct	++	+	-/+	++	++
		MM	+	+++	++	+	+

+++ jaka reaktivnost; ++ umjerena reaktivnost; + blaga reaktivnost; – bez reaktivnosti;

Rv — bubrežni mjehurić, G — nezreli glomeruli, A — ampula, Cd — sabirni kanalić, Ct — zavijeni kanalić, MM — metanefrogeni mezenhim, E — dan embrionalnog razvoja; Dishevelled (DVL-1)

4.1.1. Imunoekspresija acetiliranog α -tubulina

Acetilirani α -tubulin bio je izražen u svim razvojnim i postnatalnim strukturama bubrega *yotari* i divljih miševa. Snažna točkasta ekspresija proteina uočena je unutar apikalne membrane sabirnih kanalića, uključujući ampule i zavijene kanaliće tijekom E13.5 i E15.5, dok je u metanefrogenom mezenhimu (intersticij) tijekom E13.5 zabilježena samo difuzna perinuklearna citoplazmatska ekspresija, uz statistički značajno povećanu ekspresiju kod *yot* miševa u usporedbi s miševima divljeg tipa ($p < 0,05$, Slika 7a–d,i, Tablica 5). Među različitim razvojnim stadijima, najjača ekspresija acetiliranog α -tubulina zabilježena je u MM bubrega *yot* miševa u stadiju E13.5, gdje je 58 % stanica bilo pozitivno, pri čemu su se uglavnom bojale stanice u blizini sabirnog kanala, dok je prema periferiji obrazac ekspresije bio obrnut (Slika 7b). Ekspresija u nediferenciranim stanicama stadija Rv/G bila je slaba kod obje vrste miševa, ali je kod *yot* miševa bila izraženija.



Slika 7. Imunofluorescentno bojenje acetiliranog α -tubulina s DAPI-em u razvojnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) (a–h). Usporedba distribucije acetiliranog α -tubulina između bubrega u embrionalnim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) (a–d) te postnatalnim danima 4 (P4) i 14 (P14) kod wt i *yot* miševa (e–h). Pozitivno bojenje acetiliranog α -tubulina (strelice) prikazano je u svakoj podstrukturi bubrega (a–h). Bubrežni mjehurići/nezreli glomeruli (Rv/G), ampule/sabirni kanalići (A/Cd), zavijeni kanalići (Ct) i metanefrogeni mezenhim (MM) u E13.5 i E15.5 (a–d). Proksimalni zavijeni kanalići (pct), distalni zavijeni kanalići (dct) i glomeruli (G) u P4 i P14 (e–h) kod wt i *yot* miševa. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 100 μm . Postotak stanica pozitivnih na acetilirani α -tubulin u wt i *yot* miševa po strukturi kroz različite faze bubrega u razvoju (i) i postnatalnog bubrega (j). Deset podstruktura analizirano je u E13.5 i E15.5, a dvadeset u P4 i P14. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) i analizirani dvosmjernim ANOVA testom, nakon čega

je primijenjen Tukeyjev test višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su na sljedeći način: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,00001$.

Acetilirani α -tubulin bio je snažno izražen u perinuklearnoj citoplazmi i apikalnoj membrani postnatalnih bubrežnih struktura, posebno u visceralnim epitelnim stanicama (podocitima) Bowmanove čahure i distalnim zavijenim kanalićima (dct); međutim, proksimalni zavijeni kanalići (pct) pokazivali su slabu ekspresiju proteina kod obje vrste miševa (Slika 7e–h). Ekspresija u dct miševa divljeg tipa smanjila se s 19,55 % pozitivnih stanica u P4 na 13,25 % u P14, dok se u *yot* dct povećala s 61,64 % na 65,75 % tijekom istog razdoblja (Slika 7j). Postnatalno bojenje *yot* dct bilo je značajno povećano u usporedbi s wt dct ($p < 0,0001$, Slika 7j). Najjača imunoreaktivnost na acetilirani α -tubulin uočena je na apikalnoj površini stanica i u citoplazmi dct miševa *yotari* u P14, s 65,75 % pozitivnih stanica. U skupini wt miševa u P4, 22,65 % glomerularnih stanica iskazivalo je acetilirani α -tubulin, što je bilo značajno više u odnosu na preostale tri promatrane skupine ($p < 0,001$).

Semikvantitativna analiza pokazala je blagu reaktivnost bojenja acetiliranog α -tubulina u glomerulima, ali umjerenu u distalnim zavijenim kanalićima kod miševa divljeg tipa i *yotari* tijekom postnatalnog razdoblja (Tablica 6).

Tablica 6. Intenzitet bojenja specifičnim protutijelima u bubrezima *yotari* i divljih miševa u postnatalnim danima 4 (P4) i 14 (P14).

Postnatalni dan (P)	Životinja	Struktura	Protutijelo				
			α -Tubulin	Inversin	DVL-1	Wnt5a/b	β -catenin
P4	divlji tip	G	+	-/+	+	-/+	-/+
		pct	+	-/+	-	++	+
		dct	++	+++	++	-	++
	<i>yotari</i>	G	-/+	+	+	-	-
		pct	+	-	-	+++	+
		dct	++	+++	++	-	+++
P14	divlji tip	G	+	++	++	-/+	-
		pct	-	-	+	++	-/+
		dct	+	+	+	-	++

	G	-/+	++	++	+	+
<i>yotari</i>	pct	+	-/+	+	+++	+
	dct	++	+	+	+	+++

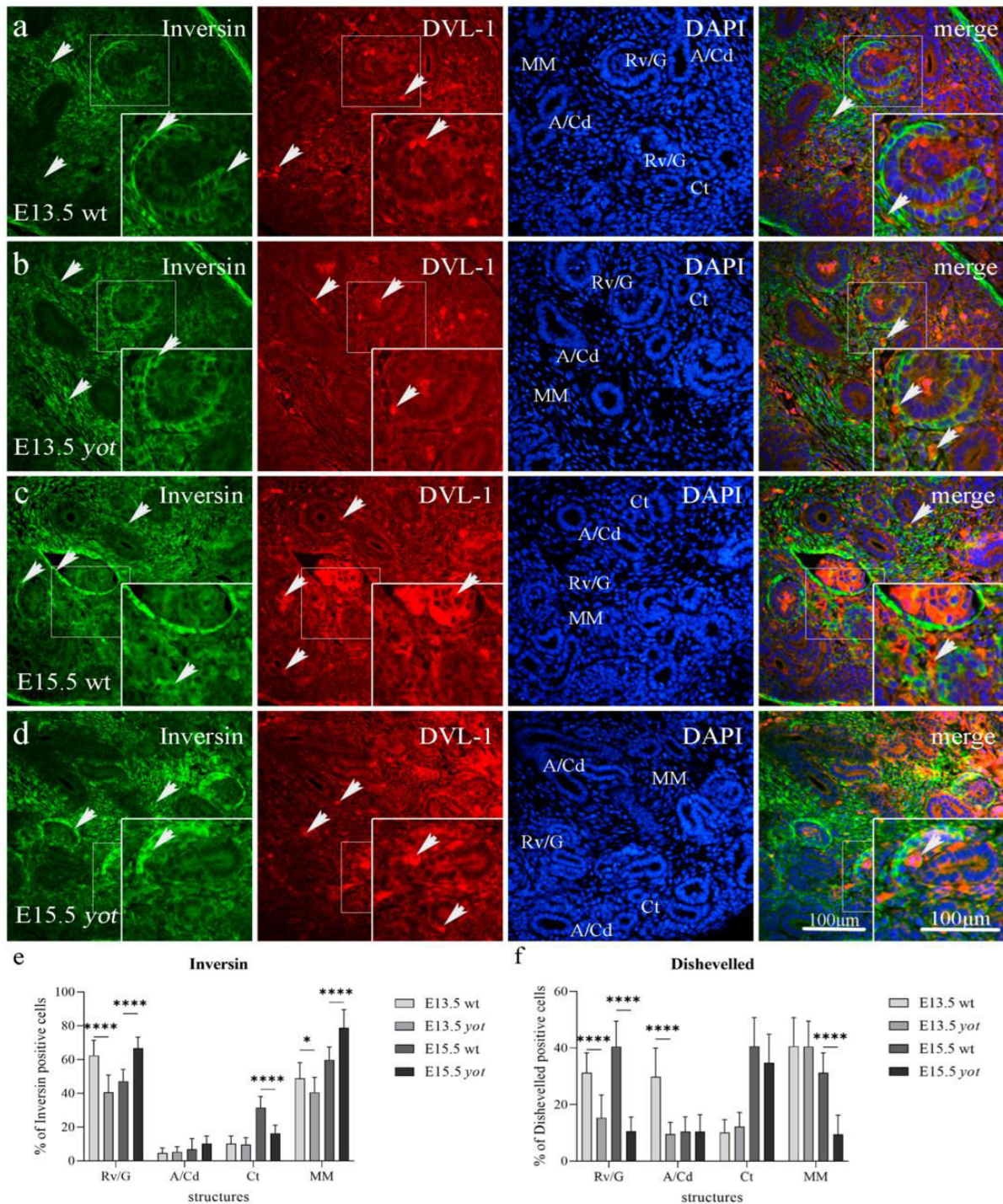
+++ jaka reaktivnost; ++ umjerena reaktivnost; + blaga reaktivnost; – bez reaktivnosti;

G — glomeruli, pct — proksimalni zavijeni kanalići, dct — distalni zavijeni kanalići, P — dan postnatalnog razvoja; Dishevelled (DVL-1).

4.1.2. Dvostruko imunofluorescentno bojenje inversina i DVL-1 u razvojnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari*

4.1.2.1. Ekspresija inversina i DVL-1 u razvojnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari*

Tijekom E13.5, inversin je pokazivao snažnu difuznu citoplazmatsku ekspresiju u parijetalnom sloju bubrežnih mjehurića i metanefrogenom mezenhimu kod miševa divljeg tipa i *yotari*. Snažna ekspresija DVL-1 uočena je u perinuklearnoj citoplazmi u svim embrionalnim bubrežnim podstrukturama kod oba tipa miševa (Slika 8a,b). Imunoreaktivnost inversina, raspršena u citoplazmi parijetalnog sloja bubrežnih mjehurića i metanefrogenog mezenhima kod miševa divljeg tipa, bila je značajno viša u usporedbi s *yotari* miševima u istom razvojnom stadiju, ali se smanjila u E15.5 ($p < 0,05$). Zavijeni kanalići (Ct) pokazali su višu ekspresiju kod miševa divljeg tipa u usporedbi s *yotari* miševima u E15.5 ($p < 0,0001$, Slika 8e). Viša ekspresija DVL-1 zabilježena je u bubrežnim mjehurićima i zavijenim kanalićima miševa divljeg tipa u E13.5 u usporedbi s *yotari* ($p < 0,0001$). Miševi divljeg tipa u E15.5 pokazali su višu proteinsku ekspresiju DVL-1 u bubrežnim mjehurićima, zavijenim kanalićima i metanefrogenom mezenhimu u odnosu na *yotari* miševima (Slika 8f). Koekspresija inversina i DVL-1 uočena je u citoplazmi svih embrionalnih bubrežnih struktura tijekom razvoja kod miševa divljeg tipa i *yotari* (vidi Sliku 8a–d, merge).



Slika 8. Dvostruko imunofluorescentno bojenje inversina (zeleno), DVL-1 (crveno) i DAPI (plavo) u razvojnim bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) u embrionalnim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5). Pozitivno bojenje (strelice) prikazano je u svakoj strukturi kroz sve faze razvoja (a–d). Spojene mikrofotografije zajedno sa strukturama od interesa u kori bubrega: bubrežni mjehurići/nezreli glomeruli (Rv/G), ampule/sabirni kanalići (A/Cd), zavijeni kanalići (Ct) i metanefrogeni mezenhim (MM) u E13.5 i E15.5. Koekspresija inversina

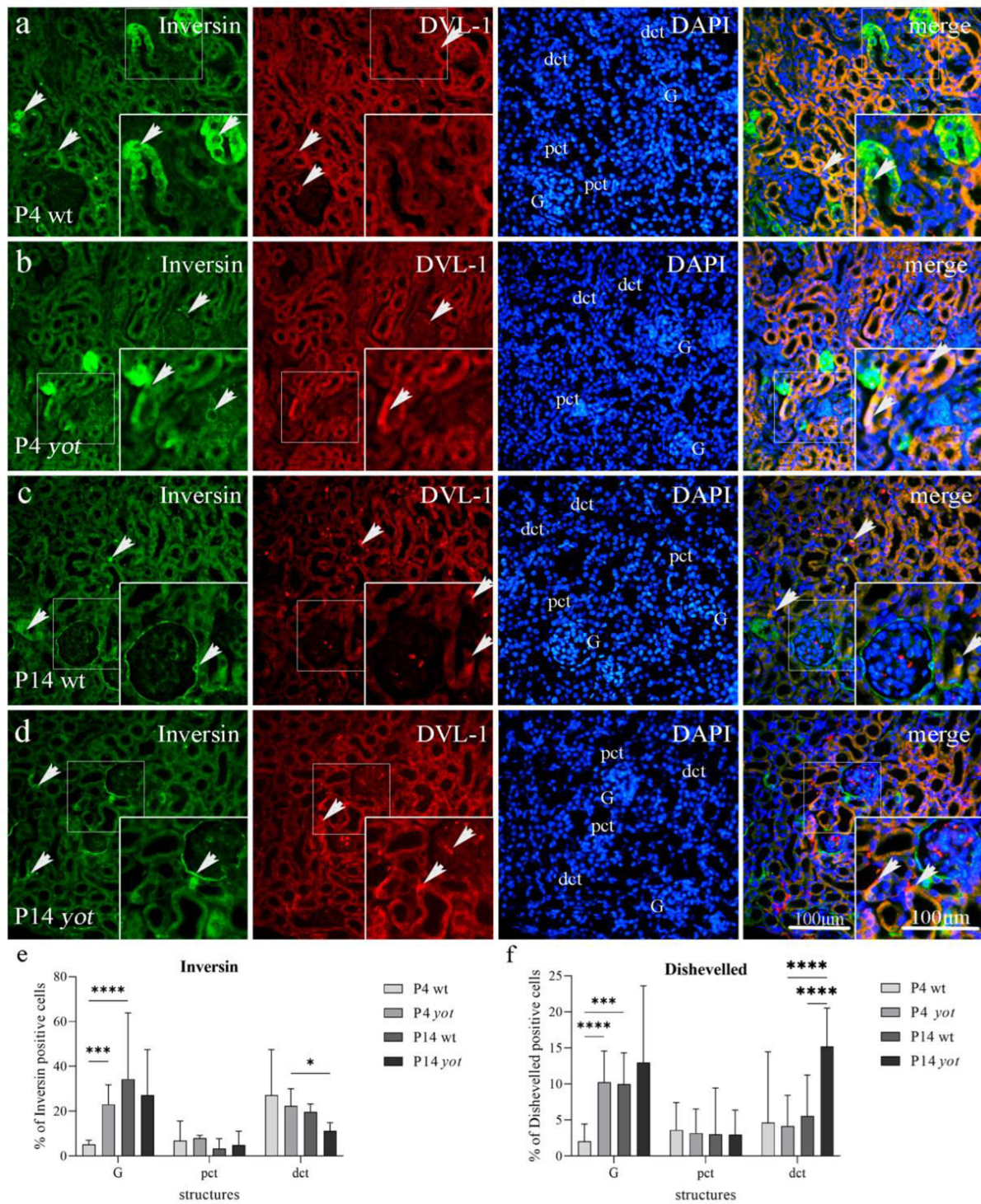
i DVL-1 (strelice) prikazana je na spojenim mikrofotografijama. Detalji su prikazani u umetcima s većim povećanjem. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 100 μm . Dinamika distribucije pozitivnih stanica na inversin i DVL-1 u bubrežnim strukturama (Rv/G, A/Cd, Ct i MM) kroz razvojne faze prikazana je na grafovima (e,f). Deset podstruktura analizirano je u svakom vremenskom trenutku. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) i analizirani dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevom višestrukou usporedbom. Značajne razlike označene su na sljedeći način: * $p < 0,05$; **** $p < 0,00001$.

Ekspresiju inversina pronašli smo u svim ispitivanim embrionalnim strukturama sa srednjom ekspresijom proteina od 54,75 % pozitivnih stanica za Rv/G, 5,8 % za A/Cd, 20,8 % za Ct i 54,35 % za MM kod miševa divljeg tipa u E13.5 i E15.5, dok su miševi *yotari* pokazali 53,6 % za Rv/G, 7,7 % za A/Cd, 12,95 % za Ct i 59,65 % za MM u istim danima. Uočena je razlika u jačini signala ekspresije inversina i DVL-1 između struktura, pri čemu je umjerena do jaka difuzna citoplazmatska ekspresija inversina primijećena u parijetalnom sloju bubrežnih mjehurića i metanefrogenom mezenhimu kod oba genotipa, dok je DVL-1 pokazivao samo blagu do umjerenu ekspresiju u istim strukturama tijekom razvoja bubrega (Tablica 5). Najviša ekspresija inversina zabilježena je u MM miševa *yotari* u E15.5, sa srednjom vrijednošću od 78,8 % pozitivnih stanica. Srednja ekspresija DVL-1 pozitivnih stanica iznosila je 35,85 % za Rv/G, 20,1 % za A/Cd, 25,35 % za Ct i 35,9 % za MM kod divljeg tipa, a 12,95 % za Rv/G, 10 % za A/Cd, 23,45 % za Ct i 24,95 % za MM kod miševa *yotari* u E13.5 i E15.5. Najveća ekspresija DVL-1 zabilježena je u Ct miševa divljeg tipa u E15.5 i u MM divljeg tipa u E13.5, obje sa srednjom vrijednošću od 40,6 % pozitivnih stanica.

4.1.2.2. Ekspresija inversina i DVL-1 u postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari*

Inversin je pokazao difuzno citoplazmatsko bojenje u parijetalnom sloju glomerula (G) i dct, te slabu reaktivnost u pct u kori bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* u P4. DVL-1 je uočen u citoplazmi G, pct i dct istog dana kod oba genotipa miševa (Slika 9a,b, Tablica 6). Miševi *yotari* u P4 pokazali su povećanu ekspresiju proteina inversina u odnosu na miševe divljeg tipa u glomerulima ($p < 0,001$). Tijekom P14, imunoreaktivnost inversina bila je prisutna u citoplazmi parijetalnog sloja Bowmanove čahure kod wt miševa. Reaktivnost inversina u dct smanjila se kako bubreg poprima zrelu morfologiju (Slika 9e). Nije bilo statistički značajnih razlika u broju pozitivnih stanica za inversin i DVL-1 u pct oba genotipa u postnatalnom razdoblju. DVL-1 je pokazao pozitivnu ekspresiju u perinuklearnoj citoplazmi svih

postnatalnih struktura u P14. Miševi divljeg tipa u P4 pokazali su nižu ekspresiju proteina DVL-1 u podocitima u usporedbi s miševima *yotari* ($p < 0,0001$). Ekspresija DVL-1 u G i dct bila je značajno povećana od P4 do P14 kod *yotari* miševa ($p < 0,001$). Koekspresija inversina i DVL-1 obilježila je stanične dijelove tubularnih stanica u pct i dct (Slika 9a–d, merge).



Slika 9. Dvostruko imunofluorescentno bojenje inversina (zeleno), DVL-1 (crveno) i DAPI (plavo) u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) 4. (P4) i 14. postnatalnog dana (P14). Pozitivno bojenje (strelice) prikazano je u svakoj strukturi tijekom svih faza razvoja (a–d). Spojene mikrofotografije prikazuju strukture od interesa u kori bubrega: proksimalni zavijeni kanalići (pct), distalni zavijeni kanalići (dct) i glomeruli (G) u P4 i P14. Koekspresija inversina i DVL-1 (strelice) prikazana je na spojenim mikrofotografijama. Detalji su prikazani u umetcima s većim povećanjem. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 100 μm . Dinamika distribucije pozitivnih stanica na inversin i DVL-1 u strukturama bubrega (G, pct i dct) kroz postnatalne faze prikazana je na grafovima (e,f). Dvadeset podstruktura analizirano je u svakom vremenskom trenutku. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) i analizirani dvosmjernom ANOVA testom s Tukeyjevom višestrukom usporedbom. Značajne razlike označene su na sljedeći način: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

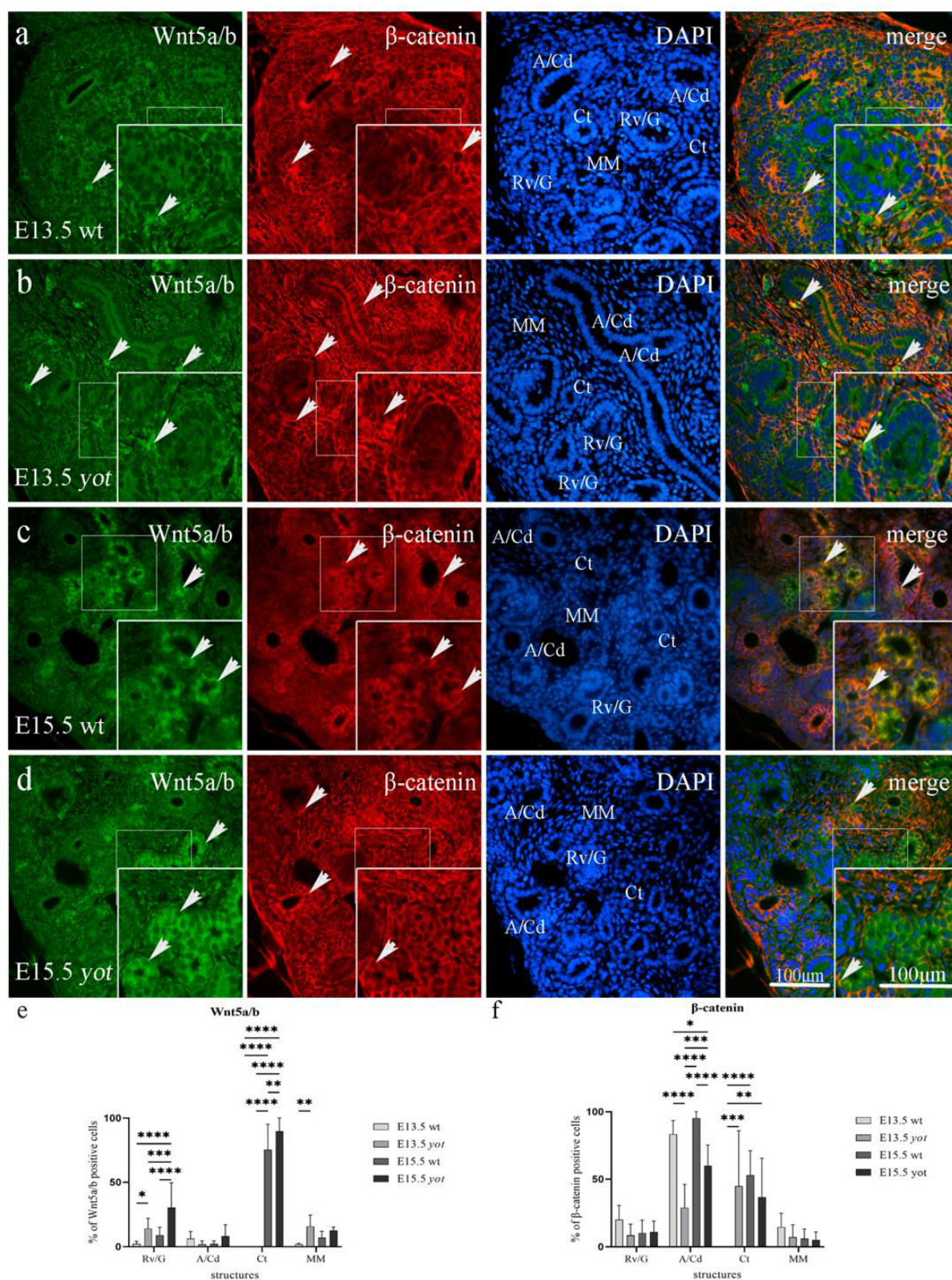
Obrazac ekspresije inversina zabilježen je u svim analiziranim postnatalnim strukturama, uključujući G, pct i dct, sa srednjom ekspresijom pozitivnih stanica od 19,71 % u G, 5,13 % u pct i 23,5 % u dct kod miševa divljeg tipa u P4 i P14, dok su *yotari* miševi pokazali 25,12 % u G, 6,48 % u pct i 16,84 % u dct u istim danima (Slika 9e). Najviša ekspresija inversina zabilježena je u G miševa divljeg tipa u P14, sa srednjom vrijednošću od 34,27 % pozitivnih stanica. Srednja ekspresija DVL-1 pozitivnih stanica iznosila je 6,02 % za G, 3,31 % za pct i 5,1 % za dct kod divljeg tipa, dok je kod *yotari* miševa iznosila 11,62 % za G, 3,07 % za pct i 9,69 % za dct u P4 i P14. Najviša ekspresija DVL-1 zabilježena je u dct miševa divljeg tipa u P14, sa srednjom vrijednošću od 15,21 % pozitivnih stanica (Slika 9f).

4.1.3. Dvostruko imunofluorescentno bojenje Wnt5a/b i β -katenina u razvojnim i postnatalnim

4.1.3.1. Ekspresija Wnt5a/b i β -katenina u razvojnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari*

Ekspresija proteina Wnt5a/b bila je blaga do umjerena u perinuklearnoj citoplazmi razvojnih struktura, poput bubrežnih mjehurića i metanefrogenog mezenhima, kod miševa *yotari*, i bila je povišena u usporedbi s bubrezima miševa divljeg tipa u E13.5, dok je snažna membranska ekspresija β -katenina uočena na apikalnoj i bazalnoj membrani svih embrionalnih struktura kod oba genotipa (Rv/G, A/Cd, Ct, MM) (Slika 10a–d, Tablica 5). Miševi *yotari* pokazali su višu ekspresiju Wnt5a/b u bubrežnim mjehurićima u usporedbi s miševima divljeg

tipa, te dodatno u zavijenim kanalićima u E15.5 ($p < 0,05$). Imunofluorescentno bojenje β -katenina bilo je značajno pojačano u ampulama, a smanjeno u zavijenim kanalićima kod miševa divljeg tipa u E13.5 u odnosu na *yotari* ($p < 0,001$). Tijekom E15.5, imunoreaktivnost β -katenina bila je povećana u sabirnim i zavijenim kanalićima kod divljeg tipa u usporedbi s miševima *yotari*. Koekspresija Wnt5a/b i β -katenina uočena je u metanefrogenom mezenhimu tijekom razvoja bubrega kod oba genotipa (Slika 10a–d, merge).



Slika 10. Dvostruko imunofluorescentno bojanje proteina Wnt5a/b (zeleno), β -katenina (crveno) i DAPI (plavo) u razvoju bubrega na embrionalnim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) kod divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) miševa. Pozitivno bojanje (strelice) prikazano je u svakoj

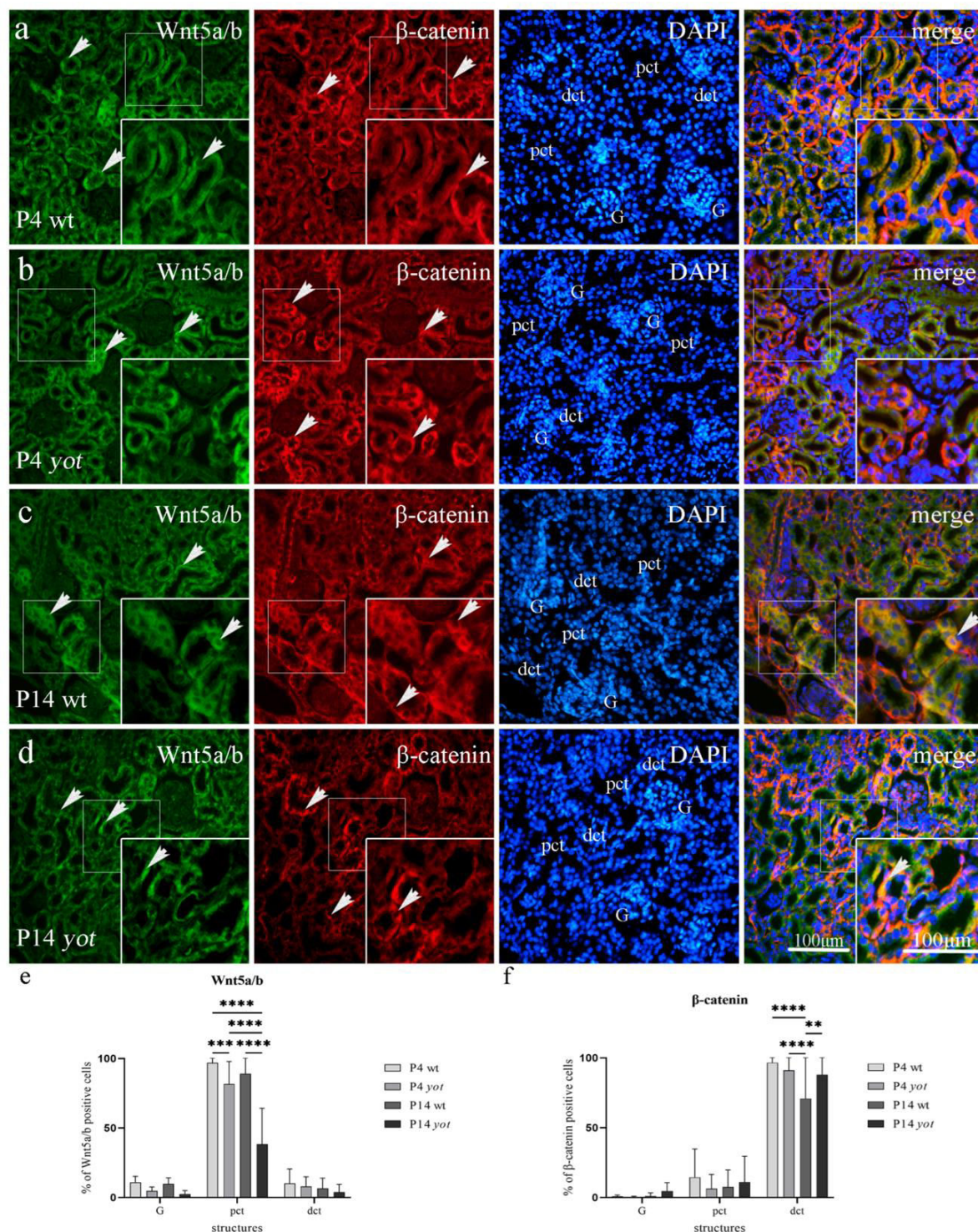
strukturi kroz sve mjehurići/nezreli glomeruli (Rv/G), ampule/sabirni kanalići (A/Cd), zavijeni kanalići (Ct) i metanefrogeni mezenhim (MM) na E13.5 i E15.5. Koekspresija Wnt5a/b i β -katenina (strelice) prikazana je na spojenim mikrofotografijama. Detalji su prikazani u umetcima s većim povećanjem. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 100 μm . Dinamika distribucije pozitivnih stanica za Wnt5a/b i β -katenin u strukturama bubrega (MM, Rv/G, A/Cd i Ct) tijekom razvoja prikazana je grafički (e,f). Deset podstrukture analizirano je u svakom vremenskom trenutku. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) i analizirani dvosmjernom ANOVA testom s Tukeyjevom višestrukom usporedbom. Značajne razlike označene su na sljedeći način: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Otkrili smo izraženost Wnt5a/b proteina u svim analiziranim embrionalnim strukturama, uključujući Rv/G, A/Cd, Ct i MM, s prosječnim udjelom pozitivnih stanica od 5,62% za Rv/G, 4,37% za A/Cd, 37,74% za Ct i 4,52% za MM kod miševa divljeg tipa na dan E13.5 i E15.5, dok je taj udio kod *yotari* miševa iznosio 22,18% za Rv/G, 5,08% za A/Cd, 44,91% za Ct i 14,12% za MM (Slika 10e). Najveća izraženost Wnt5a/b proteina zabilježena je u Ct kod *yotari* miševa na E15.5, s prosječnim udjelom pozitivnih stanica od 89,93%. Prosječna izraženost β -katenina bila je 1,58% za Rv/G, 86,93% za A/Cd, 22,19% za Ct i 1,74% za MM kod divljeg tipa na dan E13.5 i E15.5, dok je kod *yotari* miševa iznosila 9,7% za Rv/G, 23,64% za A/Cd, 7,39% za Ct i 0,28% za MM. Najveća izraženost β -katenina zabilježena je u A/Cd kod wt miševa na E15.5, s prosjekom od 95,39% pozitivnih stanica (Slika 10f).

4.1.3.2. Izraženost Wnt5a/b i β -katenina u postnatalnom bubregu miševa divljeg tipa i *yotari*

Wnt5a/b pokazao je snažno, difuzno citoplazmatsko bojanje u visceralnom sloju glomerula (G) i distalnog zavijenog kanalića (dct), dok je najsnažnija reaktivnost uočena u proksimalnom zavijenom kanaliću (pct) postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* na dan P4. Istovremeno, β -katenin bio je pretežito prisutan u bazalnoj membrani G i pct, s najjačom intenzivnošću bojenja u dct na P4 kod obje skupine miševa (Slika 11a,b, Tablica 6). Miševi divljeg tipa na P4 i P14 pokazali su statistički značajno veću izraženost Wnt5a/b proteina u pct u usporedbi s *yotari* miševima ($p < 0.001$). Nije bilo statistički značajne razlike u izraženosti Wnt5a/b u dct i G između wt i *yot* miševa ni na P4 ni na P14, a isto vrijedi i za izraženost β -katenina u G i pct (Slika 11e,f, Tablica 6). Miševi divljeg tipa na P14 pokazali su smanjenu izraženost β -katenina u dct u usporedbi s P4 ($p < 0.0001$). β -katenin kod *yotari* miševa na P14 također je bio smanjen u odnosu na P4, ali je i dalje ostao statistički viši u

usporedbi s β -kateninom kod divljeg tipa na P14 ($p < 0.01$, Slika 11c,d,f). Koekspresija Wnt5a/b i β -katenina uočena je samo povremeno u pct i dct na dan P14 (Slika 11c,d, merge).



Slika 11. Dvostruko imunofluorescentno bojanje proteina Wnt5a/b (zeleno), β -katenina (crveno) i DAPI-a (plavo) u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) 4. (P4) i 14.

postnatalnog dana (P14). Pozitivno bojanje (strelice) prikazano je u svim strukturama kroz sve faze razvoja (a–d). Spojene mikrofotografije prikazuju strukture od interesa u kori bubrega: proksimalne zavijene kanaliće (pct), distalne zavijene kanaliće (dct) i glomerule (G) u postnatalnim danima P4 i P14. Koekspresija Wnt5a/b i β -katenina (strelice) prikazana je na spojenim mikrofotografijama. Detalji su prikazani u umetcima s većim povećanjem. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 100 μm . Dinamika distribucije pozitivnih stanica za Wnt5a/b i β -katenin u strukturama bubrega (G, pct i dct) tijekom postnatalnih faza prikazana je grafički (e,f). Dvadeset podstruktura analizirano je u svakom vremenskom trenutku. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomita crta) i analizirani dvosmjernom ANOVA testom s Tukeyjevom višestrukom usporedbom. Značajne razlike označene su na sljedeći način: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Izraženost Wnt5a/b proteina utvrđena je u svim analiziranim postnatalnim strukturama, uključujući G, pct i dct, s prosječnim udjelom pozitivnih stanica od 10,34% za G, 92,93% za pct i 8,4% za dct kod miševa divljeg tipa na dan P4 i P14, dok je kod *yotari* miševa iznosila 3,65% za G, 59,94% za pct i 5,96% za dct na P4 i P14. Najveća izraženost Wnt5a/b zabilježena je u pct kod wt miševa na P4, s prosjekom od 96,85% pozitivnih stanica (Slika 11e). Prosječna izraženost β -katenina iznosila je 0,03% za G, 0,37% za pct i 95,3% za dct kod miševa divljeg tipa na P4 i P14, dok je kod *yotari* miševa iznosila 0,06% za G, 3,48% za pct i 91,04% za dct na P4 i P14. Najviša izraženost β -katenina uočena je u dct kod wt miševa na P4, s prosječnim udjelom od 96,59% pozitivnih stanica (Slika 11f).

U drugom dijelu rada prikazani su rezultati dvostrukog imunofluorescentnog bojenja kojima je analizirana ekspresija markera acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina u ljudskim fetalnim i postnatalnim uzorcima bubrega u različitim fazama razvoja, kao i u uzorcima bubrega zahvaćenih prirođenim anomalijama bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT), uključujući hipoplastične, displastične i potkovičaste bubrege te bubrege s dvostrukim ureterom. Cilj ovog dijela bio je usporediti obrasce ekspresije ovih ključnih proteina između normalnih i patoloških uzoraka kako bi se identificirali mogući molekularni mehanizmi povezani s poremećajem u izražaju markera Wnt signalizacije i diferencijaciji tijekom ljudske nefrogeneze.

4.2. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja α -tubulin, inversin, DVL-1 i β -katenin proteina u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima urođenim anomalijama bubrega i urotrakta

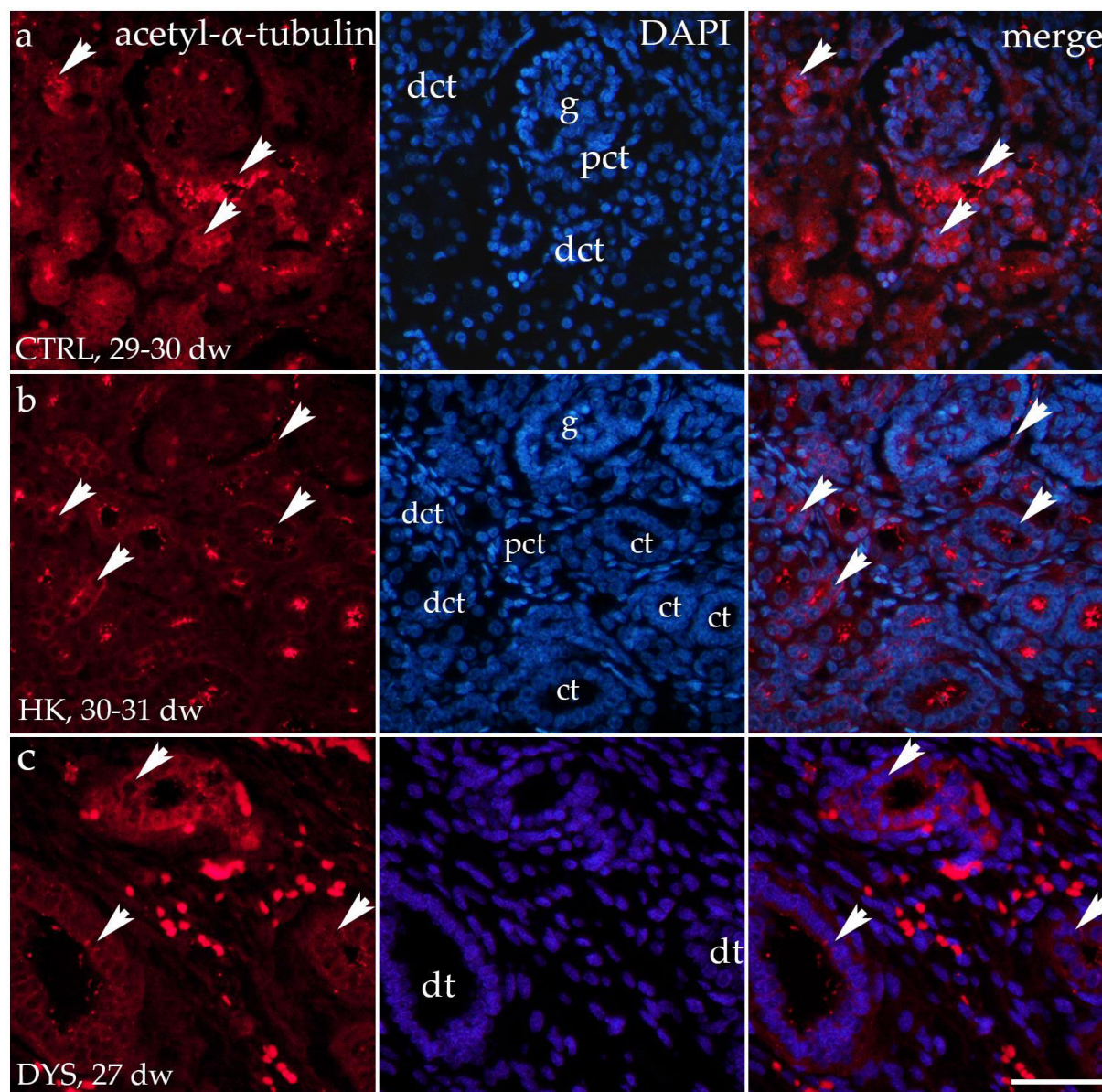
Ljudski fetalni bubrezi u razvoju i bubrezi zahvaćeni CAKUT-om (urođenim anomalijama bubrega i mokraćnog sustava) analizirani su zbog utvrđivanja intenziteta imunofluorescentnog signala i obrazaca bojenja markera acetil- α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina u tubulima, sabirnim kanalićima i glomerulima kore bubrega. Kvantitativna procjena obuhvatila je mjerenje postotka površine presjeka kortikalnog dijela fetalnog bubrega, kako u nefrogenskoj zoni, tako i u jukstamedularnoj regiji, a rezultati su prikazani kao postotci područja s pozitivnim signalom. Dinamika ekspresije i progresija promatranih markera analizirani su pomoću linearnih i nelinearnih regresijskih modela kroz različite faze razvoja.

4.2.1. Imunoekspresija acetil- α -tubulina

U skupini zdravih kontrola, imunohistokemijsko bojenje α -tubulina variralo je među promatranim strukturama. Proksimalni i distalni zavijeni kanalići u nefrogenoj zoni i jukstamedularnoj regiji kore bubrega pokazivali su izraženu punktiiformnu ekspresiju na apikalnim membranama te umjereno intenzivnu ekspresiju u perinuklearnoj citoplazmi. Visceralne i parijetalne stanice glomerula u razvoju pokazivale su blagi, povremeni punktiiformni signal (Slika 12a).

U većini promatranih CAKUT-fenotipova, obrazac bojenja bio je vrlo sličan onome u kontrolnoj skupini, sličan po lokalizaciji i intenzitetu (Slika 12b). U displastičnom bubregu, ekspresija acetil- α -tubulina uključivala je povremene signale u visceralnim stanicama glomerula i parijetalnim stanicama Bowmanove čahure. Također je zabilježeno jako, difuzno

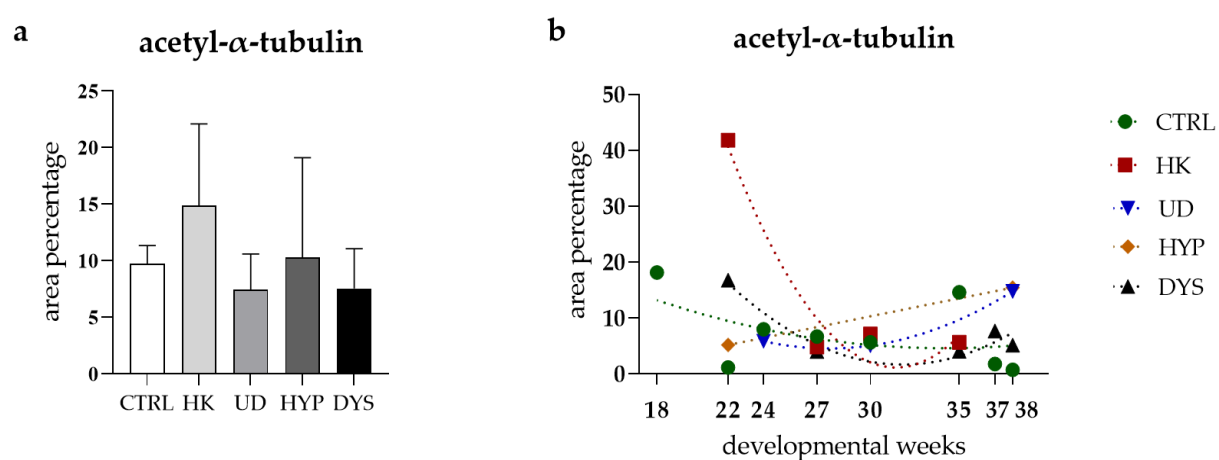
perinuklearno bojenje acetyl- α -tubulina u stanicama displastičnih zavijenih kanalića. Osim toga, mezenhimske stanice koje okružuju zavijene kanaliće pokazivale su slab punktiformni signal (Slika 12c).



Slika 12. Imunofluorescentno bojenje ljudskih fetalnih bubrega u razvoju uporabom protutijela na acetilirani α -tubulin. Pozitivno bojenje acetiliranog α -tubulina (strelice) prikazano je u podstrukturama bubrega (a–c), kao što su glomeruli (g), proksimalni zavijeni kanalići (pct), distalni zavijeni kanalići (dct), sabirni kanalići (ct) i displastični kanalići (dt), označeno na slici s nuklearnim bojenjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Usporedba distribucije acetiliranog α -tubulina između kontrole (CTRL) u 29.-30. tjednu razvoja (a), potkovičastog

bubrega (HK) u 30.-31. tjednu (b) i displastičnog bubrega (DYS) u 27. tjednu razvoja (c). Obrazac bojenja acetiliranog α -tubulina u bubrezima kontrolne skupine, bubrezima s dvostrukim ureterom (UD) i hipoplastičnim bubrezima (HYP) u velikoj mjeri odgovara po lokalizaciji i intenzitetu; stoga je odabrana reprezentativna slika iz uzorka kontrolnog bubrega u 29.-30. tjednu razvoja. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 50 μm .

Nisu zabilježene značajne razlike u postotku stanica pozitivnih na acetil- α -tubulin između kontrolne skupine i analiziranih CAKUT-fenotipova bubrega (Slika 13a).



Slika 13. Postoci područja pozitivnog acetil- α -tubulin u kori bubrega fetalnih uzoraka CTRL, HK, DYS, UD i HYP prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ SD te su analizirani pomoću jednosmjernog ANOVA testa, nakon koje je proveden Tukeyjev test višestrukih usporedbi (Slika 13a). U svakoj razvojnoj točki analizirano je deset reprezentativnih mikroskopskih slika. Dinamika ekspresije acetil- α -tubulina prikazana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem postotaka područja pozitivnog signala kroz razvojna razdoblja u kori bubrega uzoraka CTRL, HK, DYS, UD i HYP u 18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. tjednu razvoja (Slika 13b). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM.

U hipoplastičnim bubrezima (HYP) udio stanica pozitivnih na acetil- α -tubulin rastao je tijekom vremena prateći linearan trend ($R^2 = 100\%$). Nasuprot tome, u većini ostalih fenotipova udio tih stanica opadao je tijekom vremena. Među njima, samo su bubrezi s dvostrukim ureterom (UD) pokazivali pozitivan trend ($R^2 = 100\%$), dok su kontrole (CTRL), potkovičasti bubrezi (HK) i displastični bubrezi (DYS) iskazivali negativne kvadratne trendove

($R^2 = 22,20 \%$; $R^2 = 94,45 \%$; $R^2 = 89,97 \%$) (Slika 13b).

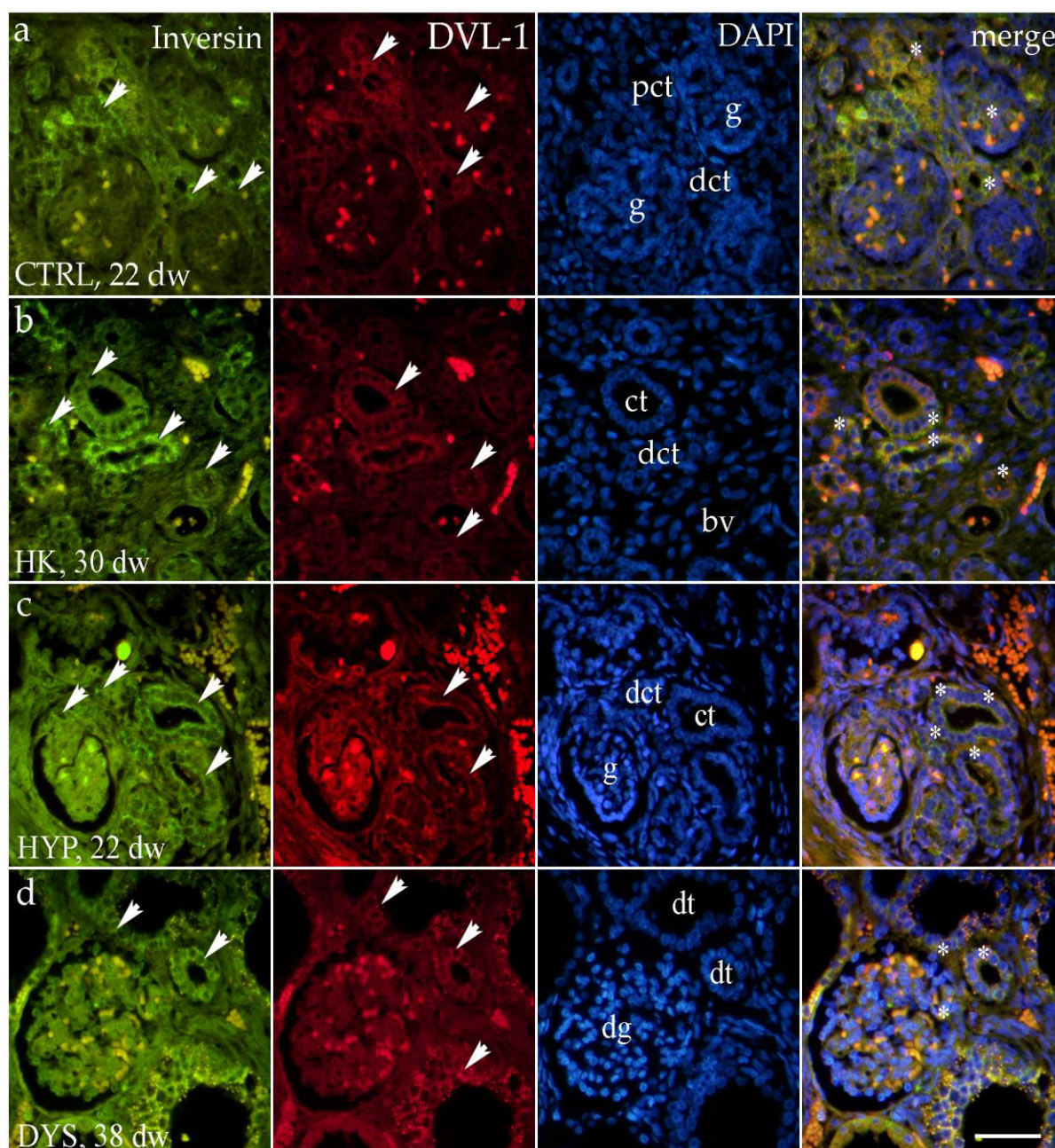
4.2.2. Dvostruko imunofluorescentno bojenje za inversin i DVL-1

Inversin je detektiran kao snažno punktiformno citoplazmatsko imunofluorescentno bojenje zelene boje duž proksimalnih i distalnih zavijenih kanalića u zdravim razvijajućim nefronima unutar nefrogene zone. Također je uočen slabiji punktiformni perinuklearni signal u visceralnom i parijetalnom sloju glomerula u razvoju (Slika 14a).

DVL-1 pozitivne stanice, prepoznate po crvenoj fluorescenciji, identificirane su u zavijenim kanalićima kao difuzno perinuklearno bojenje umjerenog intenziteta, dok su povremeno uočene i u epitelnim stanicama nezrelih glomerula u kontrolnoj skupini (Slika 14a).

Bubrezi zahvaćeni CAKUT-om pokazivali su značajno jače signale inversina, najčešće difuzno raspoređene, na apikalnoj i bazolateralnoj membrani zavijenih kanalića. Dodatno, visceralne i parijetalne stanice glomerula u displastičnim (DYS) i hipoplastičnim (HYP) bubrezima prikazivale su snažan difuzni citoplazmatski signal. Obrazac bojenja u potkovičastim (HK) i bubrezima s dvostrukim ureterom (UD) bio je sličan onome u kontrolnoj skupini (Slika 14b–d).

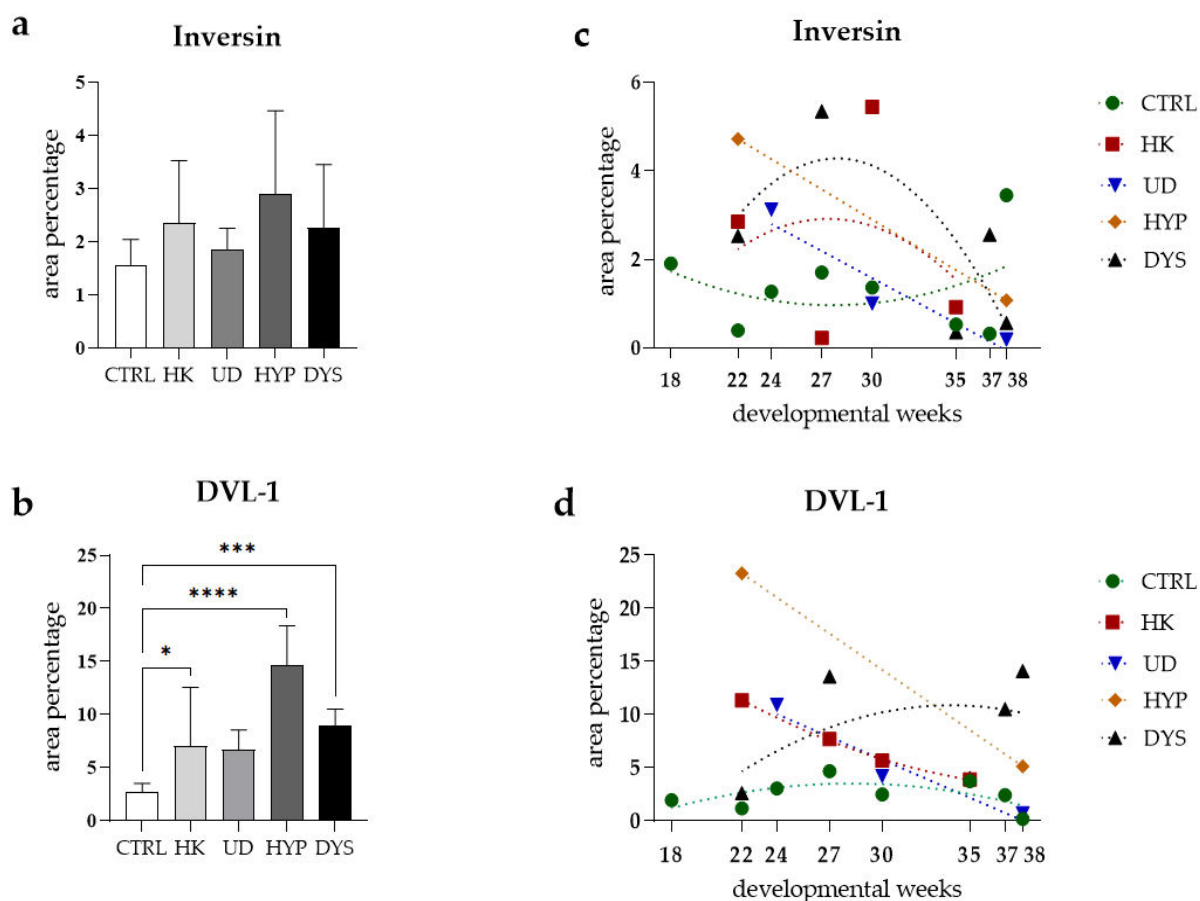
Što se tiče bojenja za DVL-1, u potkovičastim bubrezima signal je bio lokaliziran u perinuklearnoj citoplazmi zavijenih kanalića s umjerenim intenzitetom. U HYP i DYS bubrezima DVL-1 je pokazivao slab difuzni signal u parijetalnim stanicama Bowmanove čahure te jače punktiformno bojenje u zavijenim kanalićima tih uzoraka (Slika 14b–d).



Slika 14. Dvostruko imunofluorescentno bojenje ljudskih fetalnih bubrega u razvoju uporabom protutijela na inversin i Dishevelled-1 (DVL-1). Pozitivno bojenje inversina (zeleno) i DVL-1 (crveno), označeno strelicama, izraženo je u bubrežnim podstrukturama (a–d), uključujući glomerule (g), sabirne kanaliće (ct), proksimalne zavijene kanaliće (pct), distalne zavijene kanaliće (dct), krvne žile (bv), displastične kanaliće (dt) i displastične glomerule (dg), a prikazano je na slici obojenoj 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Imunoekspresija inversina, DVL-1, DAPI bojenja i spojenih signala inversina, DVL-1 i DAPI prikazana je za kontrolni uzorak (CTRL) u 22. tjednu razvoja (a), potkovičasti bubreg (HK) u 30. tjednu (b), hipoplastični bubreg (HYP) u 22. tjednu (c) i displastični bubreg (DYS) u 38. tjednu razvoja

(d). Obrasci bojenja za inversin i DVL-1 u CTRL i bubrezima s dvostrukim ureterom (UD) u velikoj mjeri odgovaraju po lokalizaciji i intenzitetu; stoga je kao reprezentativna odabrana slika kontrolnog bubrega iz 22. tjedna razvoja. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 50 μm .

Prilikom analize koekspresije inversina i DVL-1, utvrđeno je da se ona povremeno pojavljuje u glomerulima, dok je dosljedno prisutna u sabirnim kanalićima nefrogene zone te u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima (Slika 15a–d).



Slika 15. Postotci područja pozitivnog inversina i Dishevelled-1 (DVL-1) u kori fetalnih bubrega skupina CTRL, HK, DYS, UD i HYP prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ SD i analizirani pomoću jednosmjernog ANOVA testa, nakon čega je primijenjen Tukeyjev test višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike označene su kao * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (Slika 15a,b). Dinamika ekspresije inversina (Slika 15c) i DVL-1 (Slika 15d) prikazana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem promjena postotka pozitivnih područja tijekom razvojnih razdoblja u kori fetalnih bubrega skupina CTRL, HK, DYS, UD i

HYP, u 18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. gestacijskom tjednu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. U svakoj vremenskoj točki analizirano je deset reprezentativnih slika.

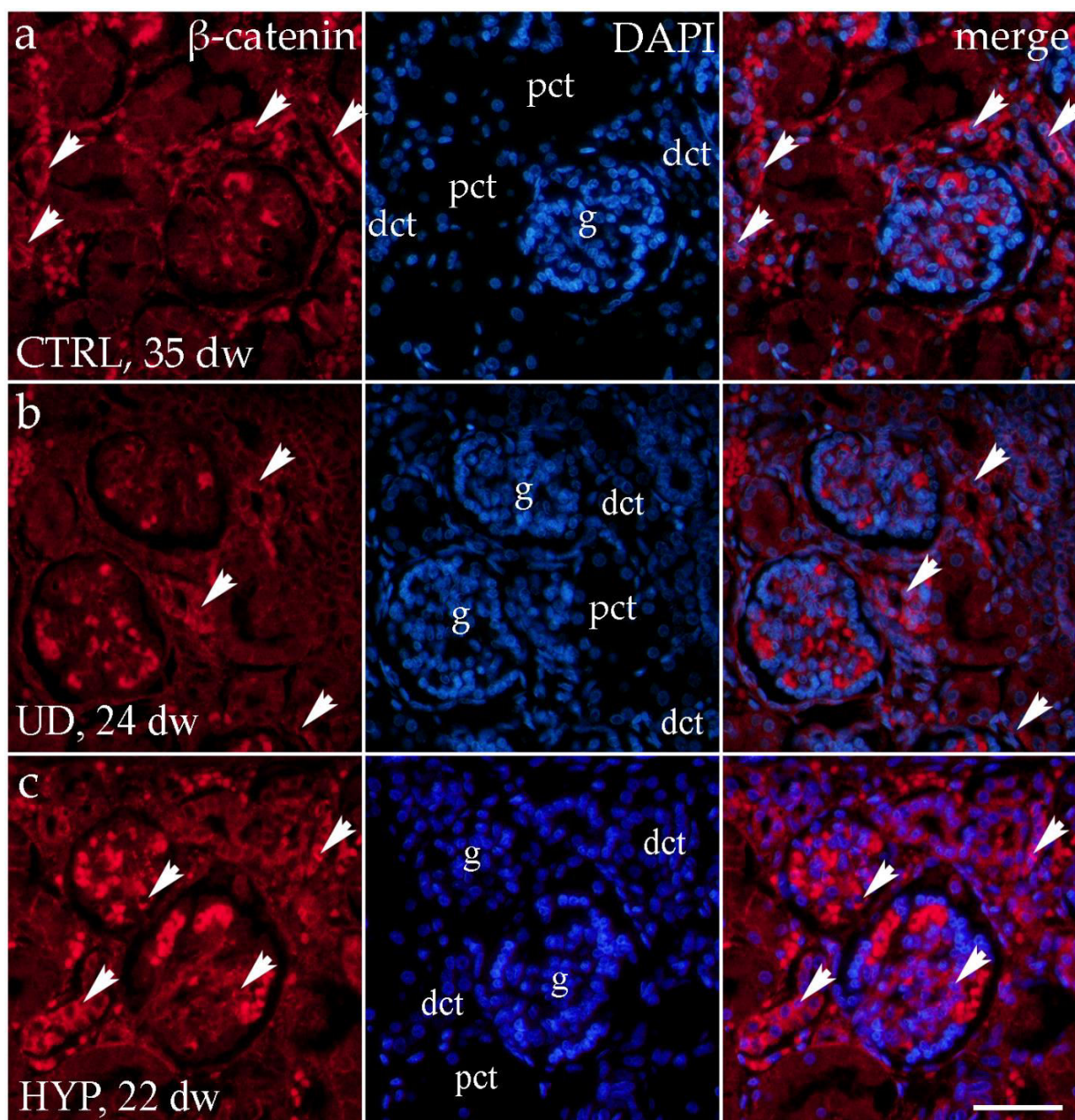
Nije pronađena statistički značajna razlika u razinama ekspresije inversina između kontrolnih i CAKUT-om zahvaćenih bubrega, dok su stanice pozitivne na DVL-1 pokazale statistički značajno smanjenje u kontrolnim uzorcima u usporedbi s CAKUT skupinama. Kod hipoplastičnih bubrega (HYP) postotak područja pozitivnog na inversin bio je najviši, dok je najniži bio u kontrolnoj skupini. Sličan trend uočen je i za DVL-1, ali uz statističku značajnost ($p < 0,0001$) (Slika 15a, b). Dodatno, unutar bubrega zahvaćenih CAKUT-om, hipoplastični bubrezi pokazali su statistički značajno višu razinu obojenosti na DVL-1 u usporedbi s HK ($p < 0,0001$), DYS ($p < 0,01$) i UD ($p < 0,0001$).

Tijekom razvoja, zabilježen je kontinuirani pad broja stanica pozitivnih na inversin u hipoplastičnim bubrezima (HYP) i bubrezima s dvostrukim ureterom (UD), pokazujući linearni trend ($R^2 = 100\%$, $R^2 = 89,26\%$, $\beta = -0,204 \pm 0,898$). Ekspresija inversina u skupinama DYS i HK slijedila je kvadratni trend unutar razvojne dobi ($R^2 = 53,87\%$, $R^2 = 7,02\%$), obje s vršnom ekspresijom u 28. gestacijskom tjednu. Kvadratni trend uočen je i u kontrolnoj skupini ($R^2 = 11,37\%$) (Slika 15c).

Slično inversinu, stanice pozitivne na DVL-1 u hipoplastičnim bubrezima (HYP) i bubrezima s dvostrukim ureterom (UD) pokazale su linearni pad kroz vrijeme ($R^2 = 100\%$, $R^2 = 93,41\%$, $\beta = -0,715 \pm 2,411$). U skupini DYS, ukupna ekspresija DVL-1 pokazala je eksponencijalni rast s razvojem gestacijske dobi, s vršnom vrijednošću u 34. tjednu ($R^2 = 22,43\%$). Ekspresija DVL-1 unutar razvojne dobi u skupinama HK i CTRL slijedila je kvadratni trend ($R^2 = 99,85\%$, $R^2 = 39,52\%$) (Slika 15d).

4.2.3. Imunoekspresija β -katenina

Imunoekspresija stanica pozitivnih na β -katenin, detektirana crvenom fluorescencijom, uočena je u proksimalnim i distalnim zavijenim kanalićima, s izraženim intenzitetom difuznog perinuklearnog bojenja. Također, snažan citoplazmatski signal detektiran je u epitelu glomerula unutar kontrolne skupine (Slika 16a).



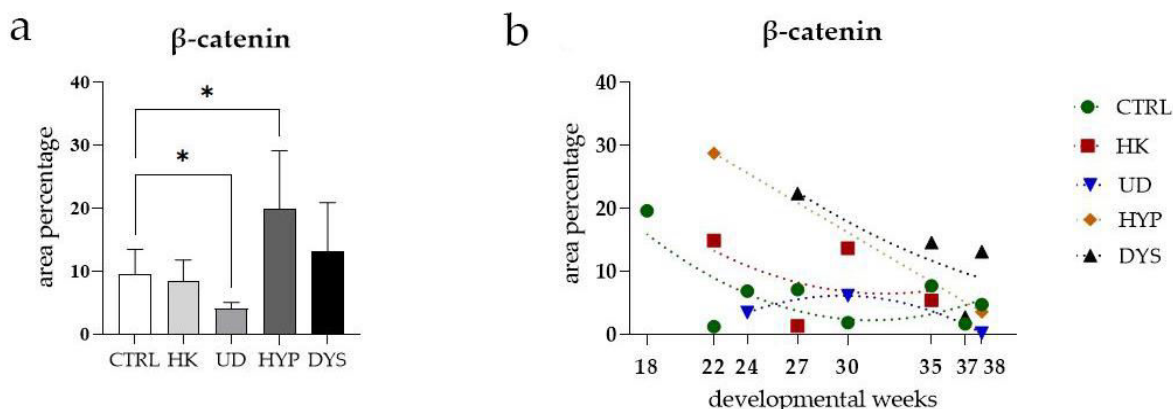
Slika 16. Dvostruko imunofluorescentno bojenje ljudskih fetalnih bubrega u razvoju uporabom protutijela na β -katenin. Pozitivno bojenje β -katenina (strelice) prikazano je u različitim podstrukturama bubrega (a–c), kao što su glomeruli (g), proksimalni zavijeni kanalići (pct) i distalni zavijeni kanalići (dct), označeno na slici bojenja jezgre pomoću 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Prikazana je usporedba distribucije β -katenina između kontrolne skupine (CTRL) u 35. tjednu (a), bubrega s dvostrukim ureterom (UD) u 24. tjednu (b) i hipoplastičnog bubrega (HYP) u 22. tjednu gestacije (c). Obrasci bojenja β -katenina u CTRL, potkovičastim (HK) i displastičnim (DYS) bubrezima uglavnom su odgovarali po lokalizaciji i intenzitetu;

stoga je kao reprezentativna slika odabrana ona iz kontrolnog uzorka bubrega u 35. tjednu. Povećanje $\times 40$, mjerna ljestvica 50 μm .

Obrasci imunoekspresije β -katenina pokazali su difuzno bojenje u perinuklearnom području zavijenih kanalića, kao i u parijetalnim i visceralnim stanicama glomerula kod bubrega zahvaćenih CAKUT-om, slično kao i u kontrolnoj skupini (Slika 16b, c).

Obrazac ekspresije β -katenina u bubrezima s dvostrukim ureterom pokazao je značajne razlike u odnosu na prethodno spomenute skupine. U tim uzorcima, ekspresija β -katenina bila je pretežno koncentrirana na apikalnim membranama zavijenih kanalića. Povremeni signali uočeni su i u glomerulima te u razvijajućim strukturama nefrogene zone.

Značajne razlike zabilježene su u postotku područja pozitivnog na β -katenin među analiziranim skupinama, pri čemu je hipoplastični bubreg (HYP) pokazao najveći udio pozitivnih stanica u usporedbi s bubrezima s dvostrukim ureterom (UD) ($p < 0,01$) i kontrolnom skupinom (CTRL) ($p < 0,01$) (Slika 17a).



Slika 17. Postotci područja pozitivnog na β -katenin u kori fetalnih bubrega skupina CTRL, HK, DYS, UD i HYP prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ SD i analizirani pomoću jednosmjernog ANOVA testa, nakon čega je primijenjen Tukeyjev test višestrukih usporedbi (Slika 17a). U svakoj vremenskoj točki analizirano je deset reprezentativnih mikroskopskih slika. Dinamika ekspresije β -katenina prikazana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem promjena postotka pozitivnih područja tijekom razvojnih razdoblja u kori fetalnih bubrega skupina CTRL, HK, DYS, UD i HYP, u 18., 22., 24., 27., 30., 35., 37. i 38. gestacijskom tjednu (Slika 17b). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM.

Ekspresija β -katenina u bubrezima s dvostrukim ureterom slijedila je kvadratni obrazac u odnosu na razvojnu dob, s vršnom vrijednošću u 30. tjednu ($R^2 = 100\%$). Suprotno tome, u kontrolnoj skupini ($R^2 = 53,84\%$), potkovičastim bubrezima (HK) ($R^2 = 21,70\%$) i displastičnim bubrezima (DYS) ($R^2 = 61,54\%$) zabilježen je eksponencijalni pad. Hipoplastični bubrezi (HYP) pokazali su linearni pad ekspresije ($R^2 = 100\%$) (Slika 17b).

5. RASPRAVA

5.1. Izražaj acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Nefrogeneza, koja se kod miševa proteže čak i u rani postnatalni period, sastoji se od složenih procesa koji su precizno koordinirani interakcijom velikog broja gena, dok je CAKUT do sada povezan s mutacijama u više od 20 gena (188, 189). Zbog visoke ekspresije DAB1 u našem prethodnom istraživanju tijekom normalnog razvoja bubrega u ljudskim fetusu, pretpostavili smo da bi DAB1 mogao imati ulogu u razvoju bubrega (175). Cilj ove studije, u kojoj smo usporedili *yotari* (*Dab1*^{-/-}) miševima s miševima divljeg tipa, bio je utvrditi razlike u prostorno-vremenskim obrascima raspodjele acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u embrionalnim i postnatalnim razvojnim fazama te njihovu povezanost s prijelazom između kanonskog i nekanonskog Wnt signalnog puta, čiji poremećaj može rezultirati pojavom CAKUT-a.

Aktivacija Wnt puta posredovana primarnim cilijama tijekom razvoja bubrega omogućuje proliferaciju stanica, diferencijaciju i morfogenezu tkiva. Brojna djeca s poremećenom funkcijom primarnih cilija i disrupcijom Wnt signalizacije razviju kroničnu bubrežnu bolest (190). Primarne cilije djeluju kao prekidač između kanonske i nekanonske aktivnosti Wnt signalnog puta, moguće odlučujući između regenerativnog i pro-fibrotičnog učinka ponovne ekspresije Wnt-a u oštećenom bubregu (107). Studija Han i sur. naglasila je važnost očuvanja primarnih cilija tijekom akutnog oštećenja bubrega, poput ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja i transplantacije bubrega, kako bi se izbjegle pro-fibrotične promjene uzrokovane epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (191). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila ultrastrukturna morfologija primarnih cilija i je li EMT aktiviran u bubrezima *yotari* miševa.

Kanonski Wnt β -katenin signalni put regulira sudbinu stanica, proliferaciju i preživljavanje tijekom ranih faza morfogeneze bubrega. Pomoću β -katenin-odgovornog TCF/ β -gal reporterskog miša, aktivacija kanonskog Wnt puta pronađena je u epitelu granajućeg ureteričnog pupoljka i tijekom indukcije mezonefričkog mezoderma u procesu tubularne diferencijacije (90, 192). Suprotno tome, nekanonski Wnt put planarne stanične polarizacije više je povezan s diferencijacijom, staničnom polarnošću i migracijom, te tako kontrolira proces MET-a. Neke nekanonske/PCP komponente izražene su u razvijajućem epitelu bubrega, poput UB, renalnim vezikulima i S-oblikovanim tijelima, ukazujući na njihovu ulogu u orijentaciji diobe stanica, pokretima, adheziji i doprinosu morfogenezi zrelog nefrona (193).

Zaključak da je kanonski Wnt signalni put aktivniji u ranoj nefrogenezi, dok se tijekom sazrijevanja nefrona gasi, a da istovremeno nekanonski PCP put postaje aktivan, objašnjava da je prijelaz s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put ključan za normalnu nefrogenezu. Wnt β -katenin put aktivira se u životinjskim modelima kod akutnog i kroničnog oštećenja bubrega, a može djelovati kao zaštitni ili štetni mehanizam (194). Naša studija pokazuje prijelaz s nekanonske na kanonsku Wnt signalizaciju u postnatalnom bubregu *yotari* miševa, što može dovesti do CAKUT-a.

Rezultati ove studije pokazuju da je ukupna ekspresija proteina acetiliranog α -tubulina i inversina tijekom normalnog razvoja bubrega povećana, s višom ekspresijom kod *yotari* miševa kako bubrežni poprima zrelu morfologiju, osim za acetilirani α -tubulin u MM-u, gdje je ukupna ekspresija smanjena, i za inversin u korteksu, gdje je ekspresija viša kod miševa divljeg tipa. Nasuprot tome, studija Šolić i sur. pokazala je smanjenje ukupne ekspresije tih markera kako strukture bubrega sazrijevaju (155). Ekspresija DVL-1 proteina raste u Rv/G i korteksu miševa divljeg tipa tijekom nefrogeneze, ali opada u A/Cd i MM, dok raste u Cd i korteksu, a opada u Rv/G i MM kod *yotari* miševa, u usporedbi s padajućom ekspresijom u našoj prethodnoj studiji. Povremeno se bilježi i koekspresija proteina inversina i DVL-1, najčešće u MM tijekom nefrogeneze, a potom i u pct i dct tijekom postnatalnog perioda. Slično studiji Šolić i sur., naši rezultati pokazuju blagi porast ekspresije inversina, ali pad DVL-1 u zdravim postnatalnim bubrežima, što potvrđuje zaključak da nekanonski Wnt put ostaje aktivan nakon rođenja, dok se kanonski put gasi (155). Ova otkrića podržavaju naše ranije istraživanje o ekspresiji ova dva proteina tijekom razvoja embrionalnog ljudskog bubrega i upućuju na to da DAB1 može igrati ulogu u razvoju bubrega miševa aktiviranjem različitih nizvodnih puteva, uključujući Wnt signalnu kaskadu (175).

Lokalizacija inversina (cistoproteina) u osnovi primarnih cilija u stanicama bubrežnih tubula smatra se ključnom za inhibiciju kanonskog Wnt signalnog puta putem razgradnje citosolnog, ali ne i membranom vezanog DVL-a, čime se održava normalno izduživanje i pozicioniranje tubula. Mutacija inversina dovodi do abnormalne proliferacije stanica tubula, što kroz proces cistogeneze rezultira razvojem CAKUT spektra bolesti (149, 195). Membranom vezani DVL aktivira nekanonski Wnt/PCP signalni put. Za kretnju konvergentne ekstenzije tijekom gastrulacije kod zametaka *Xenopus laevis* i izduživanje dijelova animalnog kapa, oba kontrolirana nekanonskim Wnt signalnim putem, inhibicija kanonskog puta posredovana inversinom pokazala se esencijalnom. Diversin, molekula koja djeluje kao prekidač i koja strukturno nalikuje inversinu, pokazao je terapijski učinak na bubrežne ciste u

zebrici izazvane gubitkom inversina, što ukazuje na to da je supresija kanonskog Wnt puta nužna za pravilan razvoj bubrega (106).

Stoga smo istražili jesu li ekspresija ovih markera i obrasci bojenja izmijenjeni u različitim fazama razvoja bubrega u miševa, uspoređujući zdravu kontrolnu skupinu s *yotari* mutantima. Ovo istraživanje je otkrilo znatno niži udio β -katenin pozitivnih stanica u zavijenim i sabirnim kanalićima *yotari* miševa u svim promatranim embrionalnim vremenskim točkama, što ukazuje na to da je β -katenin potreban za normalnu morfogenezu i razvoj bubrega. Naši rezultati pokazali su veću ekspresiju β -katenina u distalnim zavijenim kanalićima postnatalnih bubrega *yotari* miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom, što implicira prijelaz s nekanonskog na kanonski Wnt β -katenin signalni put. Normalna aktivacija Wnt signalnog puta dokazana je tijekom tubulogeneze, no prekomjerna aktivnost kanonskog Wnt puta u transplantiranim bubrezima pokazala se kao pozitivni prognostički čimbenik za razvoj bubrežne fibroze (149, 196). Studije na modelima akutne bubrežne ozljede nakon ishemijskih ili nefrotoksičnih oštećenja pokazale su da Wnt β -katenin ima renoprotektivni učinak, dok njegovo specifično uklanjanje iz tubularnih stanica pogoršava oštećenje (194). Međutim, produljena i kronična stimulacija ovog signalnog puta može dovesti do nastanka i progresije CKD (197). Uzimajući sve navedeno u obzir, β -katenin bi mogao predstavljati potencijalnu terapijsku metu u borbi protiv bubrežne fibroze, i to putem redukcije njegove hiperaktivacije prirodnim spojevima, specifičnim inhibitorima ili genskom modifikacijom (198).

Wnt5a/b, koji može aktivirati i kanonski i nekanonski Wnt put, predstavlja ligand za sedam-transmembranski receptor Frizzled-5 te za Ror2. Ključan je za regulaciju razvojnih putova tijekom embriogeneze, kao i za procese onkogeneze. Globalni „knockout“ Wnt5a u miševa rezultirao je brojnim, ali ozbiljnim bubrežnim fenotipovima, uključujući agenezu, fuziju bubrega, hidronefrozu i duplicirane bubrege/uretere (199). Wnt5a/b sudjeluje u regulaciji polariteta stanica u miševa, a poremećaj PCP puta doveo je do formiranja cisti (200). Istraživanje Huang i sur. pokazalo je da Wnt5a morfanti imaju neorganizirane pronefričke cilije, što upućuje na mogućnost da Wnt5a regulira pravilan razvoj bubrega putem kontrole ciliogeneze i PCP-a, što bi mogla biti tema daljnjih istraživanja (199). Naši rezultati pokazali su značajno povećanje ekspresije Wnt5a/b u proksimalnim zavijenim kanalićima postnatalnih bubrega divljeg tipa u odnosu na *yotari*, što potvrđuje da nekanonski Wnt/PCP signalni put ostaje aktivan i nakon rođenja u zdravom bubregu.

Imunoekspresija Wnt5a/b zabilježena je u svim strukturama tijekom gestacije, osim u sabirnim kanalićima (Ct) u stadiju E13,5 kod oba tipa miševa, gdje *yotari* miševi pokazuju više

ekspresiju u odnosu na divlji tip. U postnatalnom razdoblju, uočeno je značajno povećanje ekspresije Wnt5a/b u proksimalnim zavijenim kanalićima bubrega divljeg tipa u odnosu na *yotari*, što potvrđuje njegovu ulogu u nefrogenezi. Ko-ekspresija Wnt5a/b i β -katenina uočena je tijekom nefromogeneze u metanefričkom mezenhimu kod divljeg tipa i *yotari* miševa, ali samo povremeno u dct i pct tijekom postnatalnog razvoja.

Tijekom normalne morfogeneze bubrega, na prijelaz između kanonskog i nekanonskog Wnt signalnog puta može se ukazivati dinamika uzoraka imunoekspresije proteina acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina kroz različite faze razvoja bubrega. Njihova ravnoteža i izraženost u svim ispitivanim bubrežnim strukturama upućuju na njihovu važnu ulogu u normalnom razvoju bubrega. Smatramo da njihova međusobna interakcija određuje transkripcijsku aktivaciju kanonskog Wnt puta ili redoslijed migracije i polarizacije stanica tijekom razvoja bubrega unutar nekanonskog signalnog puta. Ključno otkriće ove studije je da su razine β -katenina i citosolnog DVL-1 smanjene u metanefričkom mezenhimu embrionalnih bubrega *yotari* miševa u usporedbi s divljim tipom, dok su razine inversina i Wnt5a/b povećane. To sugerira da prijelaz s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put nastupa ranije kod *yotari* miševa, što potencijalno dovodi do preranog završetka nefrogeneze i tako pridonosi fenotipu bubrežne hipoplazije. Nadalje, β -katenin i citosolni DVL-1 su povećani u postnatalnim bubrežima *yotari* miševa, što upućuje na prijelaz s nekanonskog na pretjerano aktivirani kanonski Wnt signalni put, što bi moglo biti dodatni uzrok bubrežne patologije ili pak kompenzacijski mehanizam. Nasuprot tomu, zdravi bubrezi pokazuju postnatalnu ekspresiju inversina i Wnt5a/b, čime održavaju nekanonsku Wnt signalizaciju. Stoga, poremećaji u ekspresiji α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u bubrežima *yotari* miševa mogli bi predstavljati temeljni patološki mehanizam i posljedicu prijelaza s nekanonskog na kanonski Wnt signalni put u razvojnim i postnatalnim bubrežima, što može rezultirati CAKUT-om i oštećenjem bubrežne funkcije, uključujući kronično zatajenje bubrega.

5.2. Izražaj acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina u zdravim fetalnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim CAKUT-om

Fenotipovi CAKUT-a, definirani kao svaka abnormalnost u veličini, obliku, položaju, broju ili funkciji bubrega i/ili urogenitalnog trakta, mogu se klasificirati na temelju anatomske lokacije ili funkcionalnih defekata (109). Spektar CAKUT-a, koji čini 23 % urođenih anomalija, obuhvaća širok raspon malformacija kao što su ageneza bubrega, hipoplazija/displazija bubrega, multicistična displazija bubrega, duplicirani sabirni sustav bubrega, opstrukcija spoja pijelouretera, megaureter, stražnji uretralni zalisci i vezikoureteralni refluks (VUR) (180, 201). Identifikacija monogenih ljudskih CAKUT gena ukazala je na to da abnormalnosti u nefrogenezi proizlaze iz poremećaja signalnih putova, dok poremećaji gena odgovornih za inervaciju mokraćnog mjehura rezultiraju disfunkcijom mokraćnog mjehura i posljedičnim anomalijama gornjeg mokraćnog sustava (111). Cilj ove studije, koja je uključivala razvoj zdravih bubrega i bubrega zahvaćenih CAKUT-om kod ljudi, bio je identificirati razlike u prostorno-vremenskim obrascima distribucije acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina te istražiti njihovu moguću povezanost s poremećajem kanonskog i nekanonskog Wnt signaliziranja koje u konačnici dovodi do CAKUT-a.

Kanonski Wnt β -katenin signalni put regulira transkripciju ciljnih gena važnih za određivanje sudbine stanica duž embrionalnih osi, dok Wnt put planarne stanične polarnosti upravlja polarizacijom stanica tijekom gastrulacije i neurulacije. Iako su oba puta regulirana lokaliziranom Wnt aktivnošću, njihovi nizvodni signalni mehanizmi značajno se razlikuju (202). Evolucijski konzervirani Wnt β -katenin signalni put ima ključnu ulogu u embrionalnoj nefrogenezi i organizaciji stanica, obično je potisnut u odrasloj dobi, ali se može reaktivirati tijekom ozljede bubrega i regeneracije (203, 204). Primjena egzogenih Wnt antagonista, kao što su proteini slični Frizzled receptorima (sFRP4), Dickkopf proteini (Dkk1), Klotho te β -katenin inhibitor ICG-001, značajno smanjuje nakupljanje β -katenina u bubregu i inhibira ekspresiju njegovih ciljnih gena, čime se ublažava fibroza bubrega u modelima kronične bubrežne bolesti (204, 205). Privremeno Wnt β -katenin signaliziranje inducira popravak i regeneraciju tijekom akutne bubrežne ozljede, dok trajna aktivacija ovog puta pogoduje razvoju bubrežne fibroze, oštećenju podocita i mineralno-koštanoj bolesti povezanoj s CKD-om (206). U studiji Xiao i sur., korištenjem miševa podvrgnutih umjerenoj (20 min) i teškoj (30 min) ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi (IRI), utvrđeno je da umjerena IRI inducira akutno zatajenje bubrega i aktivaciju β -katenina, nakon čega slijedi oporavak bubrega, dok teška IRI rezultira trajnom aktivacijom β -katenina i razvojem CKD-a s fibroznim promjenama bubrega

(207).

Analiza postotka područja nije otkrila značajne razlike u postotku stanica pozitivnih na acetilirani α -tubulin između kontrolnih i CAKUT fenotipova bubrega. Promatrajući trend imunopozitivnosti promatranog proteina tijekom razvoja, naši rezultati ukazuju na smanjenje ukupne ekspresije acetiliranog α -tubulina tijekom normalnog razvoja bubrega, što je u skladu s nalazima Šolić i sur. (155). Suprotno tome, hipoplastični bubreg pokazuje porast ekspresije s pozitivnim linearnim trendom, dok bubreg s dvostrukim ureterom pokazuje eksponencijalni rast broja stanica pozitivnih na acetilirani α -tubulin tijekom vremena. S druge strane, ostali CAKUT fenotipovi pokazuju višu razinu ekspresije u ranijim stadijima, praćenu negativnim kvadratnim trendom kako razvoj napreduje. Promjene u sastavu mikrotubula mogle bi utjecati na integritet slojeva epitela. Također, nedavni dokazi upućuju na to da tubulin i proteini povezani s mikrotubulima mogu sudjelovati u odgovorima na stanični stres, potičući preživljenje stanica raka (208).

Trendovi izražaja acetiliranog α -tubulina kroz različite fenotipove bubrega vjerojatno odražavaju različite stanične i razvojne zahtjeve za stabilnošću i integritetom mikrotubula. Tijekom normalnog razvoja bubrega, zabilježeno smanjenje razine acetiliranog α -tubulina može odgovarati smanjenoj potrebi za stabilizacijom mikrotubula, kako tkivo postiže zreliju fazu s uspostavljenom staničnom arhitekturom. To sugerira da se dinamično preuređenje mikrotubula smanjuje kako organogeneza napreduje, te da su niže razine acetiliranog α -tubulina dostatne za održavanje stanične homeostaze. Suprotno tome, u patološkim fenotipovima bubrega, poput hipoplastičnog bubrega ili dvostrukog uretera, povišena ekspresija acetiliranog α -tubulina vjerojatno predstavlja adaptivni odgovor na povećane strukturne i razvojne zahtjeve. Aberantna morfogeneza bubrega može uzrokovati povećani stanični stres te zahtijevati pojačanu stabilnost mikrotubula radi očuvanja integriteta tkiva. Povećana ekspresija acetiliranog α -tubulina u tim stanjima može predstavljati kompenzatorni mehanizam kojim se potiče otpornost mikrotubula i održava stanična organizacija u uvjetima razvojnih poremećaja. Time se potvrđuje da acetilirani α -tubulin ima ključnu ulogu u odgovoru na razvojne abnormalnosti stabilizacijom citoskeletnog sustava, omogućujući tako tkivu da se odupre mehaničkim i okolišnim stresorima povezanim s poremećenom organogenezom.

Naša istraživanja pokazala su da je razina proteina inversina u ranim fazama normalnog razvoja bubrega niža u usporedbi s CAKUT zahvaćenim bubrezima, iako bez statistički značajne razlike. Značajno je istaknuti kako je obrazac izražaja DVL-1 pratio onaj inversina, ali je pri usporedbi kontrolne i CAKUT zahvaćene skupine razlika bila statistički značajna.

Ova razlika sugerira mogući poremećaj u proliferaciji i preživljenju stanica tijekom ranih razvojnih stadija bubrega u CAKUT zahvaćenim uzorcima. Šolić i sur. su utvrdili značajno nižu ekspresiju inversina i DVL-1 u multicističnom displastičnom bubregu u odnosu na zdrave kontrole (155). Istodobno, naša studija je potvrdila kontinuirani pad broja inversin-pozitivnih stanica u hipoplastičnim bubrezima i bubrezima s dvostrukim ureterom tijekom vremena, pokazujući linearan trend, čime se dodatno podupire tvrdnja da je prijelaz na nekanonski Wnt signalni put, reguliran primarnim cilijama, narušen u razvoju bubrega zahvaćenih CAKUT-om zbog kontinuirane aktivacije kanonskog signalnog puta. U zdravim kontrolnim bubrezima zabilježen je pozitivan kvadratni trend za inversin, ali negativan za DVL-1, što potvrđuje važnost prijelaza s kanonskog na nekanonski signalni put u normalnoj nefrogenezi. Ekspresija DVL-1 u displastičnim bubrezima pokazala je eksponencijalni rast s dobi, dosegnuvši najviše razine u 34. tjednu gestacije. To ukazuje na poremećaj u prijelazu s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put tijekom nefrogeneze, čime se ometa završna diferencijacija epitelnih stanica i elongacija tubula. Naše prethodno istraživanje pokazalo je smanjene razine β -katenina i citosolnog DVL-1, uz povišene razine inversina i Wnt5a/b u embrionalnim bubrezima *yotari* (*Dab1*^{-/-}) miševa, što implicira da rani prijelaz s kanonskog na nekanonski signalni put rezultira razvojem CAKUT spektra bolesti (1). U našem trenutnom istraživanju, u displastičnim i hipoplastičnim bubrezima, β -katenin pozitivne stanice pokazale su najveći udio citoplazmatskog bojenja, što upućuje na aktivaciju kanonskog Wnt signalnog puta i razvoj CAKUT fenotipa. U kontrolnoj skupini zabilježen je postupan pad postotka β -katenin-pozitivnih stanica tijekom vremena, što odražava fiziološki prijelaz s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put, paralelno s formiranjem zrelih struktura nefrona.

Smanjene razine Wnt inhibitora Dapper3, koji se veže s Dishevelledom (DVL) i formira kompleks s citoplazmatskim proteinima poput Axina, GSK3 β , kazein kinaze 1 i β -katenina, rezultiraju akumulacijom DVL2 i β -katenina, čime se pogoršava fibrozni fenotip nakon jednostruke ureteralne opstrukcije (209).

Mutacije gena Wnt5a rezultiraju skraćenim i proširenim intermedijarnim mezodermom s dupliciranim nefričkim kanalima na posteriornom kraju prije izrastanja ureteričkog pupoljka, što ukazuje da abnormalno izduženje posteriornog nefričkog kanala dovodi do formacije dvostrukih bubrega, implicirajući disfunkciju nekanonskog Wnt5a/Ror2 signalnog puta u disgenezi intermedijarnog mezoderma (139, 165). Van Gogh-like 2, ključni protein nekanonskog Wnt/PCP signalnog puta koji regulira polariziranu staničnu migraciju, neurulaciju, razvoj srca, hematopoezu i organogenezu, kontrolira tubulogenezu bubrega putem

regulacije konvergentne ekstenzije i apikalne konstrikcije. Poremećaji u PCP signalizaciji mogu dovesti do CAKUT fenotipa (210). Rezultati istraživanja Pavlović i sur. pokazuju da ekspresija VANGL2 ostaje stabilna tijekom normalnog razvoja bubrega, dok dolazi do promjena kod bubrežne hipoplazije i displazije. Ovaj nalaz je u skladu s prethodnim istraživanjima, budući da su Babayeva i sur. prijavili displaziju u mutantnim embrionalnim bubrezima s mutacijama VANGL2, a Derish i sur. su uočili hipoplaziju u *Vangl2Δ/Δ* embrionalnim bubrezima (210-212).

Određivanje aktivacije kanonskog ili nekanonskog Wnt signalnog puta u određenom staničnom kontekstu temelji se na kombinaciji metoda, kao što su upotreba specifičnih inhibitora tankiraze, poput XAV939 ili IWR-1, koji ciljaju kanonski put inhibirajući stabilizaciju β -katenina, ili aktivatora poput CHIR99021 (213). Nadalje, imunofluorescentno bojenje ili imunoblotting se mogu koristiti za detekciju razina ekspresije i substanične lokalizacije proteina specifičnih za signalne puteve, čime se može utvrditi aktivacija kanonskog ili nekanonskog Wnt puta (195). U reporter testovima, kanonski put koristi reportere s TCF/Lef1 veznim mjestima, dok nekanonski put koristi elemente osjetljive na promjene u kalcijским ionima ili TGF- β signalizaciji (47). Kod progenitornih stanica, inhibicija Jun N-terminalne kinaze, kao kasnog koraka PCP signalizacije, ometa diferencijaciju epitela pozitivnog na E-kadherin, ukazujući na potrebu za PCP signalizacijom u završnoj diferencijaciji epitela. S druge strane, u već diferenciranom epitelu, aktivacija β -katenina dovodi do formiranja epitelnih cisti kroz inaktivaciju proteina APC ili prekomjernu ekspresiju stabiliziranog β -katenina (214). Tvrdnja da je kanonski Wnt signalni put aktivniji tijekom rane nefrogeneze, a zatim se progresivno gasi kako nefron sazrijeva, dok istovremeno nekanonski PCP signalni put pokazuje porast aktivnosti, objašnjava nužnost prijelaza s kanonskog na nekanonski signalni put tijekom normalnog razvoja nefrona (89, 155). Istraživanje Torban i sur. sugerira da PCP signalni put regulira konvergentne ekstenzijske pokrete i elongaciju tubula u razvoju bubrega, doprinoseći formaciji zrelih struktura nefrona (215). Dodatna istraživanja ukazuju da Wnt/ Ca^{2+} signalni put sudjeluje u procesima poput grananja ureteričkog pupoljka i segmentacije nefrona, ističući njegovu ulogu u kasnijim fazama morfogeneze bubrega (216). Disregulacija ovih puteva, poput aberantne aktivacije kanonskog Wnt signalnog puta, povezana je s CAKUT-om, narušavajući ključne procese poput morfogeneze grananja ureteričkog pupoljka, čime se naglašava njihova važnost za pravilnu nefrogenezu (116).

Poremećaj ovog mehanizma također je povezan s razvojnim poremećajima bubrega, poput policistične bolesti bubrega, što dodatno naglašava važnost razumijevanja molekularnih

mehanizama koji stoje iza prijelaza s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put tijekom razvoja bubrega. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnili molekularni mehanizmi tih signalnih prijelaza i njihov utjecaj na diferencijaciju bubrega. Takva saznanja mogla bi pružiti temelje za razvoj personaliziranih terapijskih strategija u liječenju kongenitalnih anomalija bubrega i mokraćnog sustava.

Glavno ograničenje našeg istraživanja jest njegova promatračka priroda. Budući da naši uzorci potječu iz arhiviranog ljudskog fetalnog materijala koji je bio parafinski uklopljen i fiksiran u formalinu, oni nisu prikladni za metode poput imunoblottinga, real-time qPCR-a (qRT-PCR) ili Western blottinga, zbog poteškoća u izolaciji visokokvalitetne RNA ili proteina. Posljedično, nismo mogli provesti kvantitativne analize ekspresije proteina, poput lokalizacije β -katenina u jezgri, kako bismo u potpunosti procijenili aktivnost kanonskog Wnt signalnog puta. Nefronski segmenti su identificirani isključivo na temelju morfologije, a ne specifičnim bojenjem, budući da mikroskop koji smo koristili ima samo dva filtera, što ograničava mogućnost istovremenog otkrivanja više od dva markera.

Unatoč navedenim ograničenjima, naši nalazi su vrijedni jer ukazuju na promjene u imunoekspresiji acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1 i β -katenina tijekom normalnog razvoja ljudskog bubrega i kod bubrežnih poremećaja. Potrebna su dodatna istraživanja na ljudskim tkivima, kao i eksperimentalna istraživanja na životinjskim modelima, kako bi se produbilo razumijevanje uloge ovih proteina unutar Wnt signalnog puta tijekom razvoja bubrega i u kontekstu CAKUT-a.

6. ZAKLJUČAK

1. Ekspresija proteina acetiliranog α -tubulina, inversina, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenina u razvojnim i ranim postnatalnim bubrezima razlikuje se između *yotari* (*Dab1*^{-/-}) i divljeg tipa miševa, što ukazuje na promjene u Wnt signalizaciji.
2. Bubrezi divljeg tipa pokazuju povišene razine β -katenina i citosolnog DVL-1 tijekom embrionalnog razdoblja, dok su za postnatalno razdoblje karakteristične povišene razine inversina i Wnt5a/b, što ukazuje kako je prijelaz s kanonske na nekanonsku Wnt signalizaciju ključan za normalnu nefrogenezu.
3. Nasuprot tome, embrionalni bubrezi *yotari* miševa pokazuju snižene razine β -katenina i citosolnog DVL-1 uz povišene razine inversina i Wnt5a/b, što upućuje na rani prijelaz s kanonske na nekanonsku Wnt signalizaciju i poremećaj nefrogeneze.
4. Postnatalni bubrezi *yotari* miševa pokazuju snižene razine inversina i Wnt5a/b te povišene razine β -katenina i citosolnog DVL-1, što ukazuje na prijelaz s nekanonske na pretjerano aktiviranu kanonsku Wnt signalizaciju, koja bi mogla rezultirati razvojem poremećaja iz CAKUT spektra.
5. Tijekom normalnog razvoja ljudskog bubrega, razine acetiliranog α -tubulina se postupno smanjuju, što upućuje na to da, kako organogeneza napreduje i tkivo doseže zreliju fazu s uspostavljenom staničnom arhitekturom, dolazi do smanjene potrebe za stabilizacijom mikrotubula, pri čemu su niže razine ovog proteina dovoljne za održavanje stanične homeostaze i strukturne stabilnosti.
6. U patološkim fenotipovima bubrega, poput hipoplastičnih bubrega i dvostrukih uretera, verificira se povećana ekspresija acetiliranog α -tubulina, što sugerira kompenzatorni odgovor na povećane mehaničke i razvojne zahtjeve te potrebu za očuvanjem stanične organizacije uslijed strukturnih poremećaja.
7. Ekspresija inversina u ranim fazama normalnog razvoja bubrega je niža nego u CAKUT-zahvaćenim bubrezima, iako bez statističke značajnosti, što sugerira mogući poremećaj u proliferaciji i preživljenju stanica tijekom ranih razvojnih stadija bubrega.
8. Ekspresija DVL-1 paralelna je s ekspresijom inversina, no za razliku od inversina, pokazuje statistički značajnu razliku između kontrolnih i CAKUT zahvaćenih bubrega.
9. U kontrolnim bubrezima, inversin pokazuje pozitivan kvadratni trend, dok kod hipoplastičnih i dupliciranih bubrega dolazi do kontinuiranog pada ekspresije inversin-pozitivnih stanica, što upućuje na poremećen prijelaz s kanonske na nekanonsku Wnt signalizaciju.

10. U kontrolnim bubrezima, DVL-1 pokazuje negativan kvadratni trend, dok u displastičnim bubrezima ekspresija eksponencijalno raste s razvojnim periodom, dosežući najviše razine u 34. tjednu, što ukazuje na trajnu aktivaciju kanonske signalizacije i poremećenu diferencijaciju epitelnih stanica.
11. Disregulacija prijelaza između kanonskog i nekanonskog Wnt puta, osobito prekomjerna aktivacija β -katenin signalizacije, narušava morfogenezu poput grananja ureteričkog pupoljka i segmentacije nefrona, što je povezano s CAKUT fenotipovima.
12. U našoj studiji, displastični i hipoplastični bubrezi pokazali su visok postotak citoplazmatskog β -katenina, što upućuje na pojačanu aktivaciju kanonskog Wnt puta i razvoj CAKUT fenotipa.
13. U kontrolnim bubrezima, postotak β -katenin pozitivnih stanica smanjuje se tijekom vremena, odražavajući normalni prijelaz s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put tijekom formiranja zrelih struktura nefrona.

7. SAŽETAK

Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT) obuhvaćaju širok spektar strukturnih i funkcionalnih malformacija, koje se mogu pojaviti izolirano ili kao dio sindroma višestrukih malformacija, čine 20–30 % svih kongenitalnih anomalija otkrivenih prenatalnom ultrazvučnom dijagnostikom te su odgovorne za 40–50 % slučajeva bubrežnog zatajenja u dječjoj dobi, s kliničkom slikom koja varira od slučajnih nalaza do terminalnog zatajenja bubrega. Razvoj bubrega reguliran je složenim genskim mrežama i signalnim putevima, među kojima se ističe Wnt signalizacija, uključena u proces nefrogeneze, morfogeneze i diferencijacije nefrona. Poremećaji u izmjeni između kanonskog i nekanonskog Wnt signalnog puta povezani su s pojavom različitih fenotipova CAKUT-a.

Ova studija istražuje obrasce ekspresije ključnih proteina uključenih u regulaciju kanonskog i nekanonskog Wnt signalnog puta tijekom razvoja bubrega, koristeći *yotari* (*Dab1*^{-/-}) mišji model i fetalno ljudsko bubrežno tkivo, uključujući normalne i CAKUT-om zahvaćene bubrege. Cilj ove studije bio je istražiti vremensko-prostornu ekspresiju ključnih markera Wnt signalnog puta - α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b i β -katenin u bubrezima *yotari* (*Dab1*^{-/-}) miševa tijekom embrionalnog razvoja (E13.5 i E15.5) i ranog postnatalnog razdoblja (P4 i P14), kao i u ljudskim fetalnim bubrezima (18.-38. tjedan gestacije), uključujući zdrave i CAKUT-om zahvaćene uzorke (hipoplastični i displastični bubrezi, bubrezi s dvostrukim ureterom, potkovičasti bubreg). Analize su provedene metodom dvostruke imunofluorescencije, a kvantifikacija signala omogućila je usporedbu ekspresijskih obrazaca među različitim razvojnim fazama i fenotipovima.

Bubreg miševa divljeg tipa pokazuje povećane razine β -katenina i citosolnog DVL-1 tijekom embrionalnog razdoblja, dok su povišene razine inversina i Wnt5a/b karakteristične za postnatalno razdoblje, što upućuje na to da je prijelaz s kanonskog na nekanonski Wnt signalni put ključan za normalnu nefrogenezu. U *yotari* modelu embrionalni bubreg pokazuje smanjene razine β -katenina i citosolnog DVL-1 te povišene razine inversina i Wnt5a/b, što sugerira rani prijelaz s kanonske na nekanonsku Wnt signalizaciju, dok povišene razine β -katenina i citosolnog DVL-1 u postnatalnim bubrezima *yotari* miševa upućuju na reaktivaciju kanonskog Wnt puta.

U ljudskim fetalnim bubrezima uočen je pad ekspresije acetiliranog α -tubulina tijekom normalnog razvoja, pri čemu su niže razine ovog proteina dovoljne za održavanje stanične homeostaze i strukturne stabilnosti, dok je najviši udio pozitivnih stanica detektiran u potkovičastom bubregu kao kompenzatorni mehanizam kojim se potiče otpornost mikrotubula i održava stanična organizacija u uvjetima razvojnih poremećaja. Nadalje, kontinuirano

smanjenje inversin-pozitivnih stanica u hipoplastičnim i bubrezima s dvostrukim ureterom te eksponencijalni porast DVL-1 u displastičnim bubrezima povezani su s perzistentnom aktivacijom kanonskog puta, čime se inhibira završna diferencijacija bubrega. U CAKUT-om zahvaćenim bubrezima zabilježena je trajna aktivacija kanonskog puta, osobito izražena kroz visoku ekspresiju β -katenina u displastičnim i hipoplastičnim bubrezima, dok se u normalnim uzorcima njegova ekspresija smanjivala s fetalnim razvojem.

Dobiveni rezultati ukazuju na ključnu ulogu ravnoteže i pravovremenog prijelaza između kanonske i nekanonske Wnt signalizacije u normalnoj nefrogenezi te na potencijalne poremećaje tog procesa u razvoju CAKUT-a. Ispitivani markeri pokazali su potencijalnu dijagnostičku i terapijsku vrijednost, kao i mogućnost primjene u daljnjem istraživanju molekularnih mehanizama bubrežnog razvoja i patologije.

8. LAIČKI SAŽETAK

Prirođene malformacije bubrega i mokraćnog sustava se ubrajaju među najčešće razvojne poremećaje u djece. Neki od njih su blagi i otkriju se slučajno, dok drugi mogu dovesti do teškog oštećenja bubrega ili čak zatajenja. Iako znamo da geni imaju veliku ulogu u razvoju bubrega, još uvijek nije potpuno jasno kako dolazi do ovih poremećaja.

Ova doktorska disertacija usmjerena je na proučavanje Wnt signalnog puta - važnog sustava komunikacije među stanicama koji upravlja rastom i razvojem bubrega. Istraživanje je provedeno na modelu miša s genetskom mutacijom te na ljudskom bubrežnom tkivu, uključujući i uzorke s prirođenim anomalijama.

Rezultati pokazuju da ravnoteža između različitih oblika Wnt signalizacije mora biti precizno usklađena u točno određeno vrijeme. Kada dođe do odstupanja, razvoj bubrega može krenuti u krivom smjeru. Neki od proučavanih proteina mogli bi u budućnosti poslužiti kao biljezi za ranije prepoznavanje ovih poremećaja, pa čak i kao ciljevi za razvoj novih terapija.

9. SUMMARY

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) comprise a broad spectrum of structural and functional malformations, which may occur in isolation or as part of syndromes involving multiple organ systems. They account for 20–30% of all congenital anomalies detected by prenatal ultrasound and are responsible for 40–50% of pediatric renal failure, with clinical manifestations ranging from incidental findings to end-stage renal disease. Kidney development is regulated by complex genetic networks and signaling pathways, among which Wnt signaling plays a crucial role in nephrogenesis, morphogenesis, and nephron differentiation. Disruptions in the switch between canonical and non-canonical Wnt signaling have been associated with the emergence of various CAKUT phenotypes.

This study investigates the expression patterns of key proteins involved in the regulation of canonical and non-canonical Wnt signaling during kidney development, using the *yotari* (*Dab1*^{-/-}) mouse model and human fetal kidney tissue, including both healthy and CAKUT-affected samples. The aim was to examine the spatiotemporal expression of key Wnt pathway markers - α -tubulin, inversin, DVL-1, Wnt5a/b, and β -catenin - in developing (E13.5 and E15.5) and early postnatal (P4 and P14) kidneys of *yotari* mice, as well as in human fetal kidneys (18th–38th gestational week), including healthy samples and those with CAKUT phenotypes (hypoplastic and dysplastic kidneys, ureter duplex, horseshoe kidney). Analyses were conducted using double immunofluorescence, and signal quantification enabled comparison of expression patterns across different developmental stages and phenotypes.

Wild-type mouse kidneys showed elevated levels of β -catenin and cytosolic DVL-1 during the embryonic period, while higher levels of inversin and Wnt5a/b were characteristic of the postnatal stage, suggesting that the switch from canonical to non-canonical Wnt signaling is essential for normal nephrogenesis. In the *yotari* model, embryonic kidneys exhibited decreased β -catenin and cytosolic DVL-1 expression alongside increased levels of inversin and Wnt5a/b, indicating a premature switch to non-canonical signaling, whereas elevated β -catenin and DVL-1 levels in postnatal *yotari* kidneys suggest reactivation of the canonical Wnt pathway.

In human fetal kidneys, a decline in acetylated α -tubulin expression during normal development reflected a reduced need for microtubule stabilization as the tissue matures and cellular architecture becomes established. Conversely, the highest proportion of positive cells was observed in the horseshoe kidney, indicating a compensatory mechanism to enhance microtubule stability and maintain cellular organization in the presence of developmental

abnormalities. Furthermore, continuous reduction in inversin-positive cells in hypoplastic and duplex kidneys and an exponential increase in DVL-1 expression in dysplastic kidneys were associated with persistent activation of the canonical pathway, thereby inhibiting final kidney differentiation. CAKUT-affected kidneys exhibited sustained canonical pathway activation, particularly evident through high β -catenin expression in dysplastic and hypoplastic kidneys, while its expression decreased with developmental progression in control samples.

These findings underscore the crucial role of balanced and timely transition between canonical and non-canonical Wnt signaling in normal nephrogenesis and suggest that disturbances in this process contribute to CAKUT development. The analyzed markers demonstrated potential diagnostic and therapeutic value, as well as applicability in future research into the molecular mechanisms of kidney development and pathology.

10. LAY SUMMARY

Congenital abnormalities of the kidneys and urinary tract (CAKUT) are among the most common developmental disorders in children. While some of these conditions are mild and discovered by chance, others can lead to serious kidney damage or even kidney failure. Although genetic factors are known to play a major role, the exact causes of these abnormalities are still not fully understood.

This doctoral research focused on a key cellular communication system known as the Wnt signaling pathway, which helps control how kidney cells grow and develop. The study was conducted using a genetically modified mouse model and human fetal kidney tissue, including samples with and without congenital abnormalities.

The findings show that the balance between different branches of the Wnt signaling pathway must be carefully timed and regulated. Disruptions in this balance can interfere with normal kidney development and lead to structural defects. Several proteins studied in this research showed potential as early markers of disease or even as targets for future treatment strategies.

11. LITERATURA

1. Perutina I, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Ogorevc M, Filipovic N, et al. Disturbances in Switching between Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Characterize Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1(-/-)* (*yotari*) Mice. *Biomedicines*. 2023;11(5).
2. Perutina I, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Rizikalo A, Filipovic N, et al. Spatiotemporal distribution of Wnt signaling pathway markers in human congenital anomalies of kidney and urinary tract. *Acta histochemica*. 2025;127(1):152235.
3. Davidson AJ. Mouse kidney development. *StemBook*. Cambridge (MA)2008.
4. Lindstrom NO, McMahon JA, Guo J, Tran T, Guo Q, Rutledge E, et al. Conserved and Divergent Features of Human and Mouse Kidney Organogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2018;29(3):785-805.
5. Little M, Georgas K, Pennisi D, Wilkinson L. Kidney development: two tales of tubulogenesis. *Current topics in developmental biology*. 2010;90:193-229.
6. Schnell J, Achieng M, Lindstrom NO. Principles of human and mouse nephron development. *Nature reviews Nephrology*. 2022;18(10):628-42.
7. de Bakker BS, van den Hoff MJB, Vize PD, Oostra RJ. The Pronephros; a Fresh Perspective. *Integrative and comparative biology*. 2019;59(1):29-47.
8. Raciti D, Reggiani L, Geffers L, Jiang Q, Bacchion F, Subrizi AE, et al. Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping. *Genome biology*. 2008;9(5):R84.
9. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of development*. 2000;92(1):31-45.
10. Kakun RR, Melamed Z, Perets R. PAX8 in the Junction between Development and Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(13).
11. Rehman S, Ahmed D. Embryology, Kidney, Bladder, and Ureter. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Danish Ahmed declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2025.
12. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*: Wolters Kluwer; 2015.
13. Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. *Journal of toxicologic pathology*. 2017;30(2):125-33.
14. Drummond IA, Davidson AJ. Zebrafish kidney development. *Methods in cell biology*. 2010;100:233-60.
15. Ludwig KS, Landmann L. Early development of the human mesonephros. *Anatomy*

and embryology. 2005;209(6):439-47.

16. Sainio K. Development of the Mesonephric Kidney. 2003;p. 75-86.
17. PD Vize AW, JBL Bard. The kidney: from normal development to congenital disease. Elsevier. 2003.
18. Saxen L. Organogenesis of the Kidney. Cambridge. Cambridge University Press. 1987.
19. Saxen L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol*. 1987;1(3):385-92.
20. Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation; research in biological diversity*. 2006;74(7):402-21.
21. Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(10):791-802.
22. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006;22:509-29.
23. Osathanondh V, Potter EL. Development of human kidney as shown by microdissection. IV. Development of tubular portions of nephrons. *Archives of pathology*. 1966;82(5):391-402.
24. Nagata M. Glomerulogenesis and the role of endothelium. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2018;27(3):159-64.
25. Zhuang L, Vogel M, Villiger PM, Trueb B. Dissecting the Interaction of FGF8 with Receptor FGFR1. *Biomolecules*. 2020;10(10).
26. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127(3):469-80.
27. Grote D, Boualia SK, Souabni A, Merkel C, Chi X, Costantini F, et al. Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS genetics*. 2008;4(12):e1000316.
28. Michos O, Goncalves A, Lopez-Rios J, Tiecke E, Naillat F, Beier K, et al. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development*. 2007;134(13):2397-405.
29. Gao Z, Chen X, Zhu K, Zeng P, Ding G. Dab1 Contributes to Angiotensin II-Induced Apoptosis via p38 Signaling Pathway in Podocytes. *BioMed research international*. 2017;2017:2484303.
30. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998;14:59-88.

31. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
32. Qin K, Yu M, Fan J, Wang H, Zhao P, Zhao G, et al. Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes & diseases*. 2024;11(1):103-34.
33. Hausmann G, Banziger C, Basler K. Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(4):331-6.
34. Takada R, Satomi Y, Kurata T, Ueno N, Norioka S, Kondoh H, et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental cell*. 2006;11(6):791-801.
35. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9):a007864.
36. Barrow JR, Howell WD, Rule M, Hayashi S, Thomas KR, Capecchi MR, et al. Wnt3 signaling in the epiblast is required for proper orientation of the anteroposterior axis. *Developmental biology*. 2007;312(1):312-20.
37. Mulligan KA, Cheyette BN. Wnt signaling in vertebrate neural development and function. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2012;7(4):774-87.
38. Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 2002;297(5580):365-9.
39. Bovolenta P, Rodriguez J, Esteve P. Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development*. 2006;133(22):4399-408.
40. Freese JL, Pino D, Pleasure SJ. Wnt signaling in development and disease. *Neurobiology of disease*. 2010;38(2):148-53.
41. Yang Y. Wnt signaling in development and disease. *Cell & bioscience*. 2012;2(1):14.
42. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell*. 2005;8(5):739-50.
43. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, et al. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *American journal of human genetics*. 2004;74(3):558-63.
44. Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(1):a007898.

45. Thompson JJ, Williams CS. Protein Phosphatase 2A in the Regulation of Wnt Signaling, Stem Cells, and Cancer. *Genes*. 2018;9(3).
46. Nlandu-Khodo S, Osaki Y, Scarfe L, Yang H, Phillips-Mignemi M, Tonello J, et al. Tubular beta-catenin and FoxO3 interactions protect in chronic kidney disease. *JCI insight*. 2020;5(10).
47. Li X, Xiang Y, Li F, Yin C, Li B, Ke X. WNT/beta-Catenin Signaling Pathway Regulating T Cell-Inflammation in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2293.
48. Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell biology international*. 2002;26(5):463-76.
49. Park JS, Ma W, O'Brien LL, Chung E, Guo JJ, Cheng JG, et al. Six2 and Wnt regulate self-renewal and commitment of nephron progenitors through shared gene regulatory networks. *Developmental cell*. 2012;23(3):637-51.
50. Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(4):276-86.
51. Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Goke B, et al. Comprehensive analysis of beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/beta-catenin signaling. *BMC genomics*. 2014;15:74.
52. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(4):364-71.
53. Bienz M, Clevers H. Armadillo/beta-catenin signals in the nucleus--proof beyond a reasonable doubt? *Nature cell biology*. 2003;5(3):179-82.
54. Stadeli R, Basler K. Dissecting nuclear Wntless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mechanisms of development*. 2005;122(11):1171-82.
55. van Beest M, Dooijes D, van De Wetering M, Kjaerulff S, Bonvin A, Nielsen O, et al. Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(35):27266-73.
56. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*. 2009;17(1):9-26.
57. Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer

and development. *The EMBO journal*. 2005;24(1):73-84.

58. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stanek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Developmental cell*. 2004;7(4):525-34.

59. Khan Z, Vijayakumar S, de la Torre TV, Rotolo S, Bafico A. Analysis of endogenous LRP6 function reveals a novel feedback mechanism by which Wnt negatively regulates its receptor. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(20):7291-301.

60. Hoppler S, Kavanagh CL. Wnt signalling: variety at the core. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 3):385-93.

61. Tan RJ, Zhou D, Zhou L, Liu Y. Wnt/beta-catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney international supplements*. 2014;4(1):84-90.

62. Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2010;90(4):243-56.

63. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2011;43(10):745-56.

64. Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular cancer*. 2020;19(1):165.

65. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(1):131-9.

66. Gajos-Michniewicz A, Czyz M. WNT Signaling in Melanoma. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(14).

67. Li L, Hutchins BI, Kalil K. Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(18):5873-83.

68. Seifert JR, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(2):126-38.

69. Wallingford JB. Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos. *Annual review of cell and developmental biology*. 2012;28:627-53.

70. Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual review of genetics*. 2008;42:517-40.

71. Habas R, Dawid IB, He X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & development*. 2003;17(2):295-309.

72. Koni M, Pinnaro V, Brizzi MF. The Wnt Signalling Pathway: A Tailored Target in Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(20).
73. Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, et al. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO reports*. 2002;3(1):69-75.
74. Wang Y, Nathans J. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development*. 2007;134(4):647-58.
75. Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature*. 2003;423(6936):173-7.
76. Gao B. Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Current topics in developmental biology*. 2012;101:263-95.
77. Wang Y, Guo N, Nathans J. The role of *Frizzled3* and *Frizzled6* in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(8):2147-56.
78. Merkel CE, Karner CM, Carroll TJ. Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? *Pediatr Nephrol*. 2007;22(11):1825-38.
79. Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S. Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis*. 2008;4(2):55-9.
80. Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development*. 1998;125(21):4225-34.
81. Lin Y, Liu A, Zhang S, Ruusunen T, Kreidberg JA, Peltoketo H, et al. Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2001;222(1):26-39.
82. Itaranta P, Chi L, Seppanen T, Niku M, Tuukkanen J, Peltoketo H, et al. Wnt-4 signaling is involved in the control of smooth muscle cell fate via *Bmp-4* in the medullary stroma of the developing kidney. *Developmental biology*. 2006;293(2):473-83.
83. Wang Y, Zhou CJ, Liu Y. Wnt Signaling in Kidney Development and Disease. *Progress in molecular biology and translational science*. 2018;153:181-207.
84. Itaranta P, Lin Y, Perasaari J, Roel G, Destree O, Vainio S. Wnt-6 is expressed in the ureter bud and induces kidney tubule development in vitro. *Genesis*. 2002;32(4):259-68.

85. Yu J, Carroll TJ, Rajagopal J, Kobayashi A, Ren Q, McMahon AP. A Wnt7b-dependent pathway regulates the orientation of epithelial cell division and establishes the cortico-medullary axis of the mammalian kidney. *Development*. 2009;136(1):161-71.
86. Karner CM, Das A, Ma Z, Self M, Chen C, Lum L, et al. Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development. *Development*. 2011;138(7):1247-57.
87. Kispert A, Vainio S, Shen L, Rowitch DH, McMahon AP. Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development*. 1996;122(11):3627-37.
88. Mohamed OA, Clarke HJ, Dufort D. Beta-catenin signaling marks the prospective site of primitive streak formation in the mouse embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2004;231(2):416-24.
89. Park JS, Valerius MT, McMahon AP. Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development*. 2007;134(13):2533-9.
90. Iglesias DM, Hueber PA, Chu L, Campbell R, Patenaude AM, Dziarmaga AJ, et al. Canonical WNT signaling during kidney development. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007;293(2):F494-500.
91. Boivin FJ, Sarin S, Lim J, Javidan A, Svajger B, Khalili H, et al. Stromally expressed beta-catenin modulates Wnt9b signaling in the ureteric epithelium. *PloS one*. 2015;10(3):e0120347.
92. Marose TD, Merkel CE, McMahon AP, Carroll TJ. Beta-catenin is necessary to keep cells of ureteric bud/Wolffian duct epithelium in a precursor state. *Developmental biology*. 2008;314(1):112-26.
93. Grouls S, Iglesias DM, Wentzensen N, Moeller MJ, Bouchard M, Kemler R, et al. Lineage specification of parietal epithelial cells requires beta-catenin/Wnt signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(1):63-72.
94. Burn SF, Webb A, Berry RL, Davies JA, Ferrer-Vaquer A, Hadjantonakis AK, et al. Calcium/NFAT signalling promotes early nephrogenesis. *Developmental biology*. 2011;352(2):288-98.
95. Tanigawa S, Wang H, Yang Y, Sharma N, Tarasova N, Ajima R, et al. Wnt4 induces nephronic tubules in metanephric mesenchyme by a non-canonical mechanism. *Developmental biology*. 2011;352(1):58-69.
96. Schnell U, Carroll TJ. Planar cell polarity of the kidney. *Experimental cell research*. 2016;343(2):258-66.

97. Rocque BL, Babayeva S, Li J, Leung V, Nezvitsky L, Cybulsky AV, et al. Deficiency of the planar cell polarity protein Vangl2 in podocytes affects glomerular morphogenesis and increases susceptibility to injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(3):576-86.
98. Saburi S, Hester I, Fischer E, Pontoglio M, Eremina V, Gessler M, et al. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease. *Nature genetics*. 2008;40(8):1010-5.
99. Cizelsky W, Tata A, Kuhl M, Kuhl SJ. The Wnt/JNK signaling target gene *alcam* is required for embryonic kidney development. *Development*. 2014;141(10):2064-74.
100. Nishita M, Qiao S, Miyamoto M, Okinaka Y, Yamada M, Hashimoto R, et al. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. *Molecular and cellular biology*. 2014;34(16):3096-105.
101. Karner CM, Chirumamilla R, Aoki S, Igarashi P, Wallingford JB, Carroll TJ. Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nature genetics*. 2009;41(7):793-9.
102. Miller RK, Canny SG, Jang CW, Cho K, Ji H, Wagner DS, et al. Pronephric tubulogenesis requires Daam1-mediated planar cell polarity signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(9):1654-64.
103. McCoy KE, Zhou X, Vize PD. Non-canonical wnt signals antagonize and canonical wnt signals promote cell proliferation in early kidney development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2011;240(6):1558-66.
104. Megason SG, McMahon AP. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development*. 2002;129(9):2087-98.
105. Davidson G, Shen J, Huang YL, Su Y, Karaulanov E, Bartscherer K, et al. Cell cycle control of wnt receptor activation. *Developmental cell*. 2009;17(6):788-99.
106. Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Kronig C, et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nature genetics*. 2005;37(5):537-43.
107. Saito S, Tampe B, Muller GA, Zeisberg M. Primary cilia modulate balance of canonical and non-canonical Wnt signaling responses in the injured kidney. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2015;8:6.
108. Vivante A, Kohl S, Hwang DY, Dworschak GC, Hildebrandt F. Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. *Pediatr Nephrol*.

2014;29(4):695-704.

109. Connaughton DM, Hildebrandt F. Disease mechanisms of monogenic congenital anomalies of the kidney and urinary tract American Journal of Medical Genetics Part C. American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics. 2022;190(3):325-43.
110. Nakanishi K, Yoshikawa N. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society. 2003;45(5):610-6.
111. Kolvenbach CM, Shril S, Hildebrandt F. The genetics and pathogenesis of CAKUT. Nature reviews Nephrology. 2023;19(11):709-20.
112. Maglica M, Kelam N, Haque E, Perutina I, Racetin A, Filipovic N, et al. Immunoexpression Pattern of Autophagy Markers in Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1(-/-)(yotari)* Mice. Biomolecules. 2023;13(3).
113. Kelam N, Racetin A, Katsuyama Y, Vukojevic K, Kostic S. Immunohistochemical Expression Pattern of FGFR1, FGFR2, RIP5, and HIP2 in Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1(-/-) (yotari)* Mice. International journal of molecular sciences. 2022;23(4).
114. Patologija. Patologija et al. 5. prerađeno i dopunjeno izd. ed: Medicinska naklada; 2018. XXI, . 887 str. p.
115. Nigam A, Knoers N, Renkema KY. Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT. Seminars in cell & developmental biology. 2019;91:104-10.
116. Bridgewater D, Cox B, Cain J, Lau A, Athaide V, Gill PS, et al. Canonical WNT/beta-catenin signaling is required for ureteric branching. Developmental biology. 2008;317(1):83-94.
117. Yu C, Zheng B, Zhang L, Zhang A, Jia Z, Ding G. Wnt/beta-Catenin Signaling and Congenital Abnormalities of Kidney and Urinary Tract. Kidney Dis (Basel). 2024;10(6):588-99.
118. Kohl S, Habbig S, Weber LT, Liebau MC. Molecular causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Molecular and cellular pediatrics. 2021;8(1):2.
119. Davis TK, Hoshi M, Jain S. To bud or not to bud: the RET perspective in CAKUT. Pediatr Nephrol. 2014;29(4):597-608.
120. Walawender L, Becknell B, Matsell DG. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: defining risk factors of disease progression and determinants of outcomes. Pediatr Nephrol. 2023;38(12):3963-73.

121. Bernstein J, Meyer R. Some Speculations on the Nature and Significance of Developmentally Small Kidneys (Renal Hypoplasia). *Nephron*. 1964;1:137-43.
122. Rubenstein M, Meyer R, Bernstein J. Congenital abnormalities of the urinary system. I. A postmortem survey of developmental anomalies and acquired congenital lesions in a children's hospital. *The Journal of pediatrics*. 1961;58:356-66.
123. Kohl S, Avni FE, Boor P, Capone V, Clapp WL, De Palma D, et al. Definition, diagnosis and clinical management of non-obstructive kidney dysplasia: a consensus statement by the ERKNet Working Group on Kidney Malformations. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2022;37(12):2351-62.
124. Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1994;23(2):171-5.
125. Brenner BM, Mackenzie HS. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney international Supplement*. 1997;63:S124-7.
126. Sekine T, Miura K, Takahashi K, Igarashi T. Children's toxicology from bench to bed--Drug-induced renal injury (1): The toxic effects of ARB/ACEI on fetal kidney development. *The Journal of toxicological sciences*. 2009;34 Suppl 2:SP245-50.
127. Vivante A, Mark-Danieli M, Davidovits M, Harari-Steinberg O, Omer D, Gnatek Y, et al. Renal hypodysplasia associates with a WNT4 variant that causes aberrant canonical WNT signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(4):550-8.
128. Lemire G, Zheng B, Ediae GU, Zou R, Bhola PT, Chisholm C, et al. Homozygous WNT9B variants in two families with bilateral renal agenesis/hypoplasia/dysplasia. *American journal of medical genetics Part A*. 2021;185(10):3005-11.
129. Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, et al. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nature genetics*. 1995;9(4):358-64.
130. Raina R, Chakraborty R, Sethi SK, Kumar D, Gibson K, Bergmann C. Diagnosis and Management of Renal Cystic Disease of the Newborn: Core Curriculum 2021. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2021;78(1):125-41.
131. Gazeu A, Collardeau-Frachon S. Practical Approach to Congenital Anomalies of the Kidneys: Focus on Anomalies With Insufficient or Abnormal Nephron Development: Renal

Dysplasia, Renal Hypoplasia, and Renal Tubular Dysgenesis. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2024;27(5):459-93.

132. Sanna-Cherchi S, Caridi G, Weng PL, Scolari F, Perfumo F, Gharavi AG, et al. Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia. *Pediatr Nephrol*. 2007;22(10):1675-84.

133. McPherson E, Carey J, Kramer A, Hall JG, Pauli RM, Schimke RN, et al. Dominantly inherited renal adysplasia. *American journal of medical genetics*. 1987;26(4):863-72.

134. Pohl M, Bhatnagar V, Mendoza SA, Nigam SK. Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. *Kidney international*. 2002;61(1):10-9.

135. Sarin S, Boivin F, Li A, Lim J, Svajger B, Rosenblum ND, et al. beta-Catenin overexpression in the metanephric mesenchyme leads to renal dysplasia genesis via cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *The American journal of pathology*. 2014;184(5):1395-410.

136. Kozlov VM, Schedl A. Duplex kidney formation: developmental mechanisms and genetic predisposition. *F1000Research*. 2020;9.

137. Britt DB, Borden TA, Woodhead DM. Inverted Y ureteral duplication with a blind-ending branch. *The Journal of urology*. 1972;108(3):387-8.

138. Senel U, Tanriverdi HI, Ozmen Z, Sozubir S. Ectopic Ureter Accompanied by Duplicated Ureter: Three Cases. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2015;9(9):PD10-2.

139. Yun K, Ajima R, Sharma N, Costantini F, Mackem S, Lewandoski M, et al. Non-canonical Wnt5a/Ror2 signaling regulates kidney morphogenesis by controlling intermediate mesoderm extension. *Human molecular genetics*. 2014;23(25):6807-14.

140. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Developmental cell*. 2010;18(5):698-712.

141. Kuure S, Popsueva A, Jakobson M, Sainio K, Sariola H. Glycogen synthase kinase-3 inactivation and stabilization of beta-catenin induce nephron differentiation in isolated mouse and rat kidney mesenchymes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(4):1130-9.

142. Ide AD, Grainger S. WNT9A and WNT9B in Development and Disease. *Differentiation; research in biological diversity*. 2025;142:100820.

143. Bera A, Gupta ML, Jr. Microtubules in Microorganisms: How Tubulin Isotypes Contribute to Diverse Cytoskeletal Functions. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022;10:913809.
144. Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D, Nachury MV, Toso DB, Lohr T, et al. Effects of alpha-tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(21):10366-71.
145. Al-Bassam J, Corbett KD. alpha-Tubulin acetylation from the inside out. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(48):19515-6.
146. Berbari NF, Sharma N, Malarkey EB, Pieczynski JN, Boddu R, Gaertig J, et al. Microtubule modifications and stability are altered by cilia perturbation and in cystic kidney disease. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2013;70(1):24-31.
147. Manissorn J, Khamchun S, Vinaiphat A, Thongboonkerd V. Alpha-tubulin enhanced renal tubular cell proliferation and tissue repair but reduced cell death and cell-crystal adhesion. *Scientific reports*. 2016;6:28808.
148. Gu S, Liu Y, Zhu B, Ding K, Yao TP, Chen F, et al. Loss of alpha-Tubulin Acetylation Is Associated with TGF-beta-induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(10):5396-405.
149. Schueler M, Braun DA, Chandrasekar G, Gee HY, Klasson TD, Halbritter J, et al. DCDC2 mutations cause a renal-hepatic ciliopathy by disrupting Wnt signaling. *American journal of human genetics*. 2015;96(1):81-92.
150. Mochizuki T, Saijoh Y, Tsuchiya K, Shirayoshi Y, Takai S, Taya C, et al. Cloning of inv, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature*. 1998;395(6698):177-81.
151. Feiguin F, Hannus M, Mlodzik M, Eaton S. The ankyrin repeat protein Diego mediates Frizzled-dependent planar polarization. *Developmental cell*. 2001;1(1):93-101.
152. Morgan D, Eley L, Sayer J, Strachan T, Yates LM, Craighead AS, et al. Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Human molecular genetics*. 2002;11(26):3345-50.
153. Nurnberger J, Kribben A, Opazo Saez A, Heusch G, Philipp T, Phillips CL. The Invs gene encodes a microtubule-associated protein. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(7):1700-10.
154. Vasilyev A, Liu Y, Mudumana S, Mangos S, Lam PY, Majumdar A, et al. Collective

- cell migration drives morphogenesis of the kidney nephron. *PLoS biology*. 2009;7(1):e9.
155. Solic I, Racetin A, Filipovic N, Mardesic S, Bocina I, Galesic-Ljubanovic D, et al. Expression Pattern of alpha-Tubulin, Inversin and Its Target Dishevelled-1 and Morphology of Primary Cilia in Normal Human Kidney Development and Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(7).
 156. Ocbina PJ, Tuson M, Anderson KV. Primary cilia are not required for normal canonical Wnt signaling in the mouse embryo. *PloS one*. 2009;4(8):e6839.
 157. Lancaster MA, Gleeson JG. Cystic kidney disease: the role of Wnt signaling. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(8):349-60.
 158. Jonassen JA, San Agustin J, Follit JA, Pazour GJ. Deletion of IFT20 in the mouse kidney causes misorientation of the mitotic spindle and cystic kidney disease. *The Journal of cell biology*. 2008;183(3):377-84.
 159. Sharma M, Castro-Piedras I, Simmons GE, Jr., Pruitt K. Dishevelled: A masterful conductor of complex Wnt signals. *Cellular signalling*. 2018;47:52-64.
 160. Duan P, Bonewald LF. The role of the wnt/beta-catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2016;77(Pt A):23-9.
 161. Boligala GP, Yang MV, van Wunnik JC, Pruitt K. Nuclear Dishevelled: An enigmatic role in governing cell fate and Wnt signaling. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research*. 2022;1869(10):119305.
 162. Goggolidou P. Wnt and planar cell polarity signaling in cystic renal disease. *Organogenesis*. 2014;10(1):86-95.
 163. Susman MW, Karuna EP, Kunz RC, Gujral TS, Cantu AV, Choi SS, et al. Kinesin superfamily protein Kif26b links Wnt5a-Ror signaling to the control of cell and tissue behaviors in vertebrates. *eLife*. 2017;6.
 164. Huang L, Xiao A, Wecker A, McBride DA, Choi SY, Zhou W, et al. A possible zebrafish model of polycystic kidney disease: knockdown of wnt5a causes cysts in zebrafish kidneys. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(94).
 165. Pietila I, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Kaisto S, Tika E, van Eerde AM, Salo AM, et al. Wnt5a Deficiency Leads to Anomalies in Ureteric Tree Development, Tubular Epithelial Cell Organization and Basement Membrane Integrity Pointing to a Role in Kidney Collecting Duct Patterning. *PloS one*. 2016;11(1):e0147171.
 166. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat

region of beta-catenin. *Cell*. 1997;90(5):871-82.

167. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *The EMBO journal*. 1989;8(6):1711-7.

168. Riggleman B, Schedl P, Wieschaus E. Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell*. 1990;63(3):549-60.

169. Halt K, Vainio S. Coordination of kidney organogenesis by Wnt signaling. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(4):737-44.

170. Xue L, Cai JY, Ma J, Huang Z, Guo MX, Fu LZ, et al. Global expression profiling reveals genetic programs underlying the developmental divergence between mouse and human embryogenesis. *BMC genomics*. 2013;14:568.

171. Westphal H, Theiler, K. *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*: Springer Berlin Heidelberg. 2013.

172. Quigley J. Service organizations: review of role and structure. *Dimensions in health service*. 1985;62(2):28-9, 31-3, 8.

173. Tymms M, Kola, I. *Gene Knockout Protocols*. 2001;158.

174. Arimitsu N, Mizukami Y, Shimizu J, Takai K, Suzuki T, Suzuki N. Defective Reelin/Dab1 signaling pathways associated with disturbed hippocampus development of homozygous *yotari* mice. *Molecular and cellular neurosciences*. 2021;112:103614.

175. Racetin A, Filipovic N, Lozic M, Ogata M, Gudelj Ensor L, Kelam N, et al. A Homozygous *Dab1*(-/-) Is a Potential Novel Cause of Autosomal Recessive Congenital Anomalies of the Mice Kidney and Urinary Tract. *Biomolecules*. 2021;11(4).

176. Yoshihara Y, Setsu T, Katsuyama Y, Kikkawa S, Terashima T, Maeda K. Cortical layer V neurons in the auditory and visual cortices of normal, *reeler*, and *yotari* mice. *The Kobe journal of medical sciences*. 2010;56(2):E50-9.

177. Abramovich DR. Fetal factors influencing the volume and composition of liquor amnii. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth*. 1970;77(10):865-77.

178. Bhide A, Sairam S, Farrugia MK, Boddy SA, Thilaganathan B. The sensitivity of antenatal ultrasound for predicting renal tract surgery in early childhood. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005;25(5):489-92.

179. Werfel L, Martens H, Hennies I, Gjerstad AC, Frode K, Altarescu G, et al. Diagnostic

Yield and Benefits of Whole Exome Sequencing in CAKUT Patients Diagnosed in the First Thousand Days of Life. *Kidney international reports*. 2023;8(11):2439-57.

180. Murugapoopathy V, Gupta IR. A Primer on Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tracts (CAKUT). *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2020;15(5):723-31.

181. Chevalier RL. CAKUT: A Pediatric and Evolutionary Perspective on the Leading Cause of CKD in Childhood. *Pediatric reports*. 2023;15(1):143-53.

182. Irfan A, O'Hare E, Jelin E. Fetal interventions for congenital renal anomalies. *Translational pediatrics*. 2021;10(5):1506-17.

183. Katsoufis CP, DeFreitas MJ, Infante JC, Castellan M, Cano T, Safina Vaccaro D, et al. Risk Assessment of Severe Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT): A Birth Cohort. *Frontiers in pediatrics*. 2019;7:182.

184. Hiraoka M. Medical management of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2003;45(5):624-33.

185. Mead R, Gilmour SG, Mead A. *Statistical Principles for the Design of Experiments: Applications to Real Experiments*. Cambridge: Cambridge University Press; 2012.

186. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(8):650-2.

187. O'Rahilly R. Guide to the staging of human embryos. *Anatomischer Anzeiger*. 1972;130(5):556-9.

188. Loane M, Dolk H, Kelly A, Teljeur C, Greenlees R, Densem J. Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2011;91 Suppl 1:S31-43.

189. Nicolaou N, Renkema KY, Bongers EM, Giles RH, Knoers NV. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nature reviews Nephrology*. 2015;11(12):720-31.

190. Warady BA, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol*. 2007;22(12):1999-2009.

191. Han SJ, Jung JK, Im SS, Lee SR, Jang BC, Park KM, et al. Deficiency of primary cilia in kidney epithelial cells induces epithelial to mesenchymal transition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;496(2):450-4.

192. Gallegos TF, Kouznetsova V, Kudlicka K, Sweeney DE, Bush KT, Willert K, et al. A protein kinase A and Wnt-dependent network regulating an intermediate stage in epithelial tubulogenesis during kidney development. *Developmental biology*. 2012;364(1):11-21.
193. Carroll TJ, Das A. Planar cell polarity in kidney development and disease. *Organogenesis*. 2011;7(3):180-90.
194. Zhou D, Li Y, Lin L, Zhou L, Igarashi P, Liu Y. Tubule-specific ablation of endogenous beta-catenin aggravates acute kidney injury in mice. *Kidney international*. 2012;82(5):537-47.
195. Fuster JJ, Zuriaga MA, Ngo DT, Farb MG, Aprahamian T, Yamaguchi TP, et al. Noncanonical Wnt signaling promotes obesity-induced adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction independent of adipose tissue expansion. *Diabetes*. 2015;64(4):1235-48.
196. Hertig A, Verine J, Mougenot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, et al. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(12):2937-46.
197. Gowda SGB, Hou F, Gowda D, Chiba H, Kawakami K, Fukiya S, et al. Synthesis and quantification of short-chain fatty acid esters of hydroxy fatty acids in rat intestinal contents and fecal samples by LC-MS/MS. *Analytica chimica acta*. 2024;1288:342145.
198. Hu L, Ding M, He W. Emerging Therapeutic Strategies for Attenuating Tubular EMT and Kidney Fibrosis by Targeting Wnt/beta-Catenin Signaling. *Frontiers in pharmacology*. 2021;12:830340.
199. Huang L, Xiao A, Choi SY, Kan Q, Zhou W, Chacon-Heszele MF, et al. Wnt5a is necessary for normal kidney development in zebrafish and mice. *Nephron Experimental nephrology*. 2014;128(1-2):80-8.
200. Luyten A, Su X, Gondela S, Chen Y, Rompani S, Takakura A, et al. Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(9):1521-32.
201. Birth Defects Monitoring Program (BDMP)/Commission on Professional and Hospital Activities (CPHA) surveillance data, 1988-1991. *Teratology*. 1993;48(6):658-75.
202. Sokol SY. Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;42:78-85.
203. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T. WNT-beta-catenin signalling - a versatile player in kidney injury and repair. *Nature reviews Nephrology*. 2021;17(3):172-84.

204. Zhou L, Li Y, Zhou D, Tan RJ, Liu Y. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/beta-catenin signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(5):771-85.
205. Surendran K, Schiavi S, Hruska KA. Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(8):2373-84.
206. Huffstater T, Merryman WD, Gewin LS. Wnt/beta-Catenin in Acute Kidney Injury and Progression to Chronic Kidney Disease. *Seminars in nephrology*. 2020;40(2):126-37.
207. Xiao L, Zhou D, Tan RJ, Fu H, Zhou L, Hou FF, et al. Sustained Activation of Wnt/beta-Catenin Signaling Drives AKI to CKD Progression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(6):1727-40.
208. Parker AL, Kavallaris M, McCarroll JA. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;4:153.
209. Xue H, Xiao Z, Zhang J, Wen J, Wang Y, Chang Z, et al. Disruption of the Dapper3 gene aggravates ureteral obstruction-mediated renal fibrosis by amplifying Wnt/beta-catenin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(21):15006-14.
210. Babayeva S, Zilber Y, Torban E. Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;300(2):F549-60.
211. Pavlovic N, Kelam N, Racetin A, Filipovic N, Pogorelic Z, Prusac IK, et al. Expression Profiles of ITGA8 and VANGL2 Are Altered in Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT). *Molecules*. 2024;29(14).
212. Derish I, Lee JKH, Wong-King-Cheong M, Babayeva S, Caplan J, Leung V, et al. Differential role of planar cell polarity gene Vangl2 in embryonic and adult mammalian kidneys. *PloS one*. 2020;15(3):e0230586.
213. Vikram A, Kim YR, Kumar S, Naqvi A, Hoffman TA, Kumar A, et al. Canonical Wnt signaling induces vascular endothelial dysfunction via p66Shc-regulated reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(10):2301-9.
214. Saadi-Kheddouci S, Berrebi D, Romagnolo B, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Kahn A, et al. Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene*. 2001;20(42):5972-81.
215. Torban E, Sokol SY. Planar cell polarity pathway in kidney development, function and

disease. *Nature reviews Nephrology*. 2021;17(6):369-85.

216. Zhou Y, Wang Y, Tischfield M, Williams J, Smallwood PM, Rattner A, et al. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(9):3825-46.

12. KRATKI ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Ilija Perutina

Mjesto i datum rođenja: Čapljina, 17. 2. 1996.

Državljanstvo: bosansko-hercegovačko, hrvatsko

Adresa: Borojevići bb, 88360 Stolac,

Bosna i Hercegovina

Mail: ilija.perutina@gmail.com,

ilija.perutina@mefst.hr

Kontakt: 00387 63 215 975, 00385 97 6444 750

OBRAZOVANJE

10. 7. 2014. – 12. 7. 2020. Integrirani diplomski sveučilišni studij medicine,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru, akademska titula: doktor
medicine

31. 8. 2010. – 14. 6. 2014. Srednja škola Stolac – smjer gimnazija

31. 8. 2002. – 14. 6. 2010. Osnovna škola Stolac

NAGRADE I PRIZNANJA

24. 11. 2017. Dekanova nagrada za najuspješnije studente u akademskoj 2016/2017.
godini

4. 1. 2021. FIFA diploma za Medicinu u nogometu

RADNO ISKUSTVO

1. 9. 2022. – danas. Specijalizant Klinike za neurokirurgiju Sveučilišne Kliničke
bolnice Mostar

25. 5. 2022. – danas. Asistent na kolegiju Anatomije Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Mostaru

7. 11. 2021. – 1. 9. 2022. liječnik opće medicine u Klinici za neurokirurgiju
Sveučilišne Kliničke bolnice Mostar

1. 9. 2020. – 15. 12. 2022. liječnik opće medicine u Domu zdravlja Stolac

ČLANSTVA

2020. – danas. Liječnička komora Federacije Bosne i Hercegovine

2021. – danas. Liječnička komora Republike Hrvatske

PROFESIONALNO USAVRŠAVANJE

13. 1. 2025. – 13. 6. 2025. Stručno usavršavanje u Klinici za neurokirurgiju Kliničkog
Bolničkog Centra Zagreb, Hrvatska

23. 4. 2025. – 29. 4. 2025. Sudjelovanje u neurokirurškim seminarima Salzburg Weill
Cornell Seminar (Neurosurgery brain), Austrija

27. 1. 2025. – 31. 1. 2025. Stručno usavršavanje u sklopu Erasmus+ programa za
mobilnost nastavnog osoblja u sklopu EUPeace organizacije, Giessen
i Marburg, Njemačka

24. 11. 2023. – 25. 11. 2023. Sudjelovanje u neurokirurškom simpoziju Brainlab
Cranial Neurosurgery Symposium, München, Njemačka

12. 10. 2023. – 15. 10. 2023. Sudjelovanje u 9. kongresu Hrvatskog neurokirurškog
društva u Zadru, Hrvatska

13. 10. 2021. – 15. 10. 2021. Sudjelovanje u edukaciji i praktičnim vježbama o
osnovnom i naprednom oživljavanju odraslih i djece (European
Resuscitation Council – BLS and ALS Course Programme) u
Mostaru, Bosna i Hercegovina

4. 5. 2021. – 9. 5. 2021. Sudjelovanje u edukaciji o osnovnom i naprednom oživljavanju djece (Praktična znanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu), Hrvatska
31. 7. 2019. – 31. 8. 2019. Studentska razmjena na abdominalnoj kirurgiji Klinike za kirurgiju Sveučilišne Kliničke Bolnice u Gdańsku (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku), Poljska
30. 6. 2018. – 31. 8. 2018. Ljetna stručna praksa u Klinici za neurologiju Sveučilišne Kliničke Bolnice Mostar, Bosna i Hercegovina
31. 7. 2017. – 31. 8. 2017. Studentska razmjena na kardiologiji Klinike za kardiologiju Cardiocentre Bolnice u Samari, Rusija

ZNANSTVENI RADOVI

1. **Perutina I**, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Rizikalo A, Filipovic N, Kuzmic Prusac I, Bosnjak M, Miskovic J, Kablar B, Ghahramani N, Vukojevic K. Spatiotemporal distribution of Wnt signaling pathway markers in human congenital anomalies of kidney and urinary tract. *Acta Histochemica*. 2025; 127(1). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2025.152235>
2. Maglica M, Kelam N, **Perutina I**, Racetin A, Rizikalo A, Filipović N, Kuzmić Prusac I, Mišković J, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy-Related Proteins in Human Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(13):6829. <https://doi.org/10.3390/ijms25136829>
3. **Perutina I**, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Ogorevc M, Filipovic N, Katsuyama Y, Miskovic J, Vukojevic K. Disturbances in Switching between Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Characterize Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*(*-/-*) (*yotari*) Mice. *Biomedicines* 2023; 11(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051321>
4. Maglica M, Kelam N, **Perutina I**, Racetin A, Rizikalo A, Filipović N, Kuzmić Prusac I, Mišković J, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy-Related

Proteins in Human Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract.

International Journal of Molecular Sciences. 2024; 25(13):6829.

<https://doi.org/10.3390/ijms25136829>

5. Rizikalo A, Maglica M, Kelam N, **Perutina I**, Ogorevc M, Racetin A, Filipovic N, Katsuyama Y, Zovko Z, Miskovic J, Vukojevic K, Unraveling the Impact of Dab1 Gene Silencing on the Expression of Autophagy Markers in Lung Development. *Life (Basel)*. 2024; 14(3):316.
<https://doi.org/10.3390/life14030316>
6. Maglica M, Dragišić V, **Perutina I**, Mišković J. Gastric Perforation due to Cervical Cancer Metastasis. *Journal of Clinical Practice and Research*. 2024; 46(1): 109–112.
<https://doi.org/10.14744/cpr.2024.33043>
7. Letica L, **Perutina I**. Usporedba kratkoročnog ishoda nakon laserske hemoroidoplastike i klasične hemoroidektomije po Morgan-Milliganu. *Liječnički Vjesnik*. 2022; 144:47–51
<https://doi.org/10.26800/LV-144-1-2-6>

SAŽETCI SA SKUPOVA

1. Bosnjak M, Zovko S, **Perutina I**, Paladino J. Effect of FGS on surgical time and short term outcome for malignant brain tumor microsurgical resection. 5th Congress of Southeast European Neurosurgical Society (SEENS). Opatija, Croatia. 21st – 24th September 2022.
2. Bosnjak M, **Perutina I**, Rulj A, Paladino J. Mobile Robotic Imaging and Navigation in Spine Surgery. 9th Congress of Croatian Neurosurgical Society and joint meeting with the Czech Neurosurgical Society. Zadar, Croatia. 12th – 15th October 2023.
3. Pusic A, Cuk A, Mikulic I, **Perutina I**, Bosnjak M, Cvitkovic I, Prce A, Zovko S, Rozic I. The role of UCH-L1 and GFAP in emergency clinical practice. IFCC-EFLM (EuroMedLab Congress). Brussels, Belgium. 18th – 22nd May 202

