

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

JELENA KOMIĆ, dr. med.

**ZNAČAJ IZRAŽAJA KANDIDATNIH GENA ZA PRIROĐENE ANOMALIJE
BUBREGA I UROTRAKTA *EDA2R*, *PCDH9* I *TRAF7* TIJEKOM FETALNOG I
POSTNATALNOG RAZVOJA ČOVJEKA I MIŠA**

Doktorski rad

Split, 2026.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

JELENA KOMIĆ, dr. med.

**ZNAČAJ IZRAŽAJA KANDIDATNIH GENA ZA PRIROĐENE ANOMALIJE
BUBREGA I UROTRAKTA *EDA2R*, *PCDH9* I *TRAF7* TIJEKOM FETALNOG I
POSTNATALNOG RAZVOJA ČOVJEKA I MIŠA**

Doktorski rad

Split, 2026.

Doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost “Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava”, uz mentorstvo dr. sc. Anite Racetin, mag. educ. biol. et chem.

Objavljeni radovi na kojima se temelji doktorska disertacija:

1. **Kelam J**, Kelam N, Filipović N, Komić L, Racetin A, Komić D, et al. Expression of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) candidate genes *EDA2R*, *PCDH9*, and *TRAF7* in normal human kidney development and CAKUT. *Genes (Basel)*. 2024;15(6):702. (čimbenik odjeka: 2.8) (1)
2. **Komić J**, Kelam N, Racetin A, Filipović N, Saraga-Babić M, Ihara D, et al. Spatial and temporal expression patterns of *EDA2R*, *PCDH9*, and *TRAF7* in *yotari* (*Dab1^{-/-}*) mice: Implications for understanding CAKUT pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025;26(13). (čimbenik odjeka: 4.9) (2)

Za početak se želim posebno zahvaliti poštovanoj prof. Katarini Vukojević na pruženoj prilici za sudjelovanje na znanstvenom projektu “Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava”, kao i na ukazanom povjerenju te svakoj potpori i vrijednim savjetima tijekom pisanja znanstvenih radova.

Veliko hvala mojoj dragoj mentorici dr. sc. Aniti Racetin na nesebičnoj pomoći i potpori tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala mome Luki na beskrajnoj podršci tijekom cijelog procesa. Hvala ti što si bio moj oslonac u svim lijepim, ali i zahtjevnim trenucima.

Najljepša hvala mojoj sestri Neli i obitelji na svemu što su učinili za mene, na bezuvjetnoj podršci i ohrabrenju.

Hvala dragom Bogu što me čuvao, vodio i davao mi snagu na ovom putu.

Ovaj doktorat s posebnom ljubavlju posvećujem našem malom Petru ♡.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Anatomija bubrega	2
1.1.1. Građa bubrega	2
1.1.2. Irigacija i inervacija	2
1.2. Embriologija bubrega	3
1.3. Molekularni mehanizmi razvoja bubrega	7
1.4. Usporedba mikroskopske građe bubrega miša i čovjeka	9
1.4.1. Signalni put Reelin–DAB1 i <i>yotari</i> (<i>Dab1^{-/-}</i>) mišji model	11
1.5. Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT)	13
1.5.1. Fenotipovi prirođenih anomalija bubrega i mokraćnog sustava	13
1.5.2. Genetika	22
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	26
2.1. Ciljevi istraživanja	27
2.2. Hipoteze istraživanja	27
3. MATERIJALI I METODE	29
3.1. Etičko odobrenje	30
3.2. Prikupljanje humanih uzoraka	30
3.2.1. Izračun veličine uzorka	32
3.3. Animalni uzorci	33
3.3.1. Izračun veličine uzorka	33
3.4. Histološka analiza	34
3.4.1. Priprema tkiva bubrega za histološku analizu	34
3.4.2. Hematoksilin-eozin bojanje	34
3.4.3. Imunofluorescencijsko bojanje	35
3.5. Prikupljanje podataka - Obrada mikrofotografija i kvantifikacija	36
3.6. Izolacija RNA i qRT-PCR	37
3.7. Statistički postupci	39
4. REZULTATI	41

4.1. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja EDA2R, PCDH9 i TRAF7 proteina u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta.....	42
4.1.1. H&E bojenje normalnih ljudskih fetalnih bubrega i bubrega zahvaćenih prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta	42
4.1.2. Izražaj EDA2R u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta	45
4.1.3. Izražaj PCDH9 u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta	49
4.1.4. Izražaj TRAF7 u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta	52
4.1.5. RT-qPCR	56
4.2. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja Eda2r, Pcdh9 i Traf7 proteina u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa	57
4.2.1. Izražaj Eda2r u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa	58
4.2.2. Izražaj Pcdh9 u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa	63
4.2.3. Izražaj Traf7 u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa	68
5. RASPRAVA	76
5.1. Izražaj EDA2R, PCDH9 i TRAF7 u zdravim humanim fetalnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta.....	77
5.2. Izražaj Eda2r, Pcdh9 i Traf7 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i <i>yotari</i> miševa.....	80
6. ZAKLJUČAK	85
7. SAŽETAK.....	88
8. LAIČKI SAŽETAK	91
9. SUMMARY	93
10. LAY SUMMARY	96
11. LITERATURA	98
12. ŽIVOTOPIS	116

POPIS KRATICA

ACE – angiotenzin konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme*)

ApoER2 – receptor za apolipoprotein E 2 (engl. *apolipoprotein E receptor 2*)

BMP4 – koštani morfogenetski protein 4 (engl. *bone morphogenetic protein 4*)

BMP7 – koštani morfogenetski protein 7 (engl. *bone morphogenetic protein 7*)

CAKUT – prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (engl. *congenital anomalies of the kidney and urinary tract*)

CD2AP – protein povezan s CD2 (engl. *CD2-associated protein*)

CNV – varijanta broja kopija (engl. *copy number variation*)

Crk/CrkL – regulator kinaze CT10 / Crk-sličan protein (engl. *CT10 regulator of kinase / Crk-like*)

DAB1 – Disabled-1 adaptorski protein (engl. *disabled-1*)

DLG1 – protein homolog Discs large 1 (engl. *discs large homolog 1*)

E – embrionalni dan (engl. *embryonic day*)

EDA – ektodisplazin A (engl. *ectodysplasin A*)

EDA2R – receptor za ektodisplazin A2 (engl. *ectodysplasin A2 receptor*)

EGF – epidermalni čimbenik rasta (engl. *epidermal growth factor*)

EMT – epitelno-mezenhimski tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*)

ERA – Europsko bubrežno udruženje (engl. *European Renal Association*)

ERK1/2 – izvanstaničnim signalima regulirana kinaza 1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*)

ESPN – Europsko društvo za pedijatrijsku nefrologiju (engl. *European Society for Paediatric Nephrology*)

EUROCAT – Europski sustav nadzora prirođenih anomalija (engl. *European Surveillance of Congenital Anomalies*)

FGF2 – fibroblastni čimbenik rasta 2 (engl. *fibroblast growth factor 2*)

FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza (engl. *focal segmental glomerulosclerosis*)

GDNF – neurotrofni čimbenik podrijetlom iz glija stanica (engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*)

GFR α – alfa receptor obitelji GDNF (engl. *GDNF family receptor alpha*)

GSK-3 β – glikogen sintaza kinaza-3 beta (engl. *glycogen synthase kinase-3 beta*)

HGF – hepatocitni čimbenik rasta (engl. *hepatocyte growth factor*)

HNF1 β – hepatocitni nuklearni čimbenik 1 beta (engl. *hepatocyte nuclear factor 1 beta*)

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

KIF12 – član 12 obitelji kinezina (engl. *kinesin family member 12*)

MAPK – mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MET – mezenhimsko-epitelna transformacija (engl. *mesenchymal-epithelial transition*)

mTOR – ciljna molekula rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)

NEMO – esencijalni modulator NF- κ B (engl. *NF- κ B essential modulator*)

NF- κ B – nuklearni čimbenik kappa pojačivača lakog lanca aktiviranih B stanica (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

P – postnatalni dan (engl. *postnatal day*)

PAX2 – upareni gen 2 (engl. *paired box gene 2*)

PBX1 – transkripcijski faktor pre-B-stanične leukemije 1 (engl. *pre-B-cell leukemia transcription factor 1*)

PCDH9 – protokadherin 9 (engl. *protocadherin 9*)

Ph – faza (engl. *phase*)

PI3K – fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)

PTB – fosfotirozin-vezujuća domena (engl. *phosphotyrosine-binding domain*)

Rap1 – Ras-srodni protein 1 (engl. *ras-related protein 1*)

RET – preuređen tijekom transfekcije (engl. *rearranged during transfection*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

RR – ponavljajuća domena reelina (engl. *reelin repeat*)

SALL1 – transkripcijski faktor sličan spalt 1 (engl. *spalt-like transcription factor 1*)

SH2 – Src homologija 2 (engl. *src homology 2*)

SIX1 – homeobox protein SIX1 (engl. *SIX homeobox 1*)

TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

TNFR – receptor čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor receptor*)

TRAF – čimbenik pridružen TNF receptoru (engl. *TNF receptor-associated factor*)

TRAF7 – čimbenik 7 pridružen TNF receptoru (engl. *TNF receptor-associated factor 7*)

VEGFA – vaskularni endotelni čimbenik rasta A (engl. *vascular endothelial growth factor A*)

VLDLR – receptor za lipoproteine vrlo niske gustoće (engl. *very low-density lipoprotein receptor*)

WNT4 – član 4 Wnt obitelji (engl. *Wnt family member 4*)

WNT6 – član 6 Wnt obitelji (engl. *Wnt family member 6*)

WNT9B – član 9B Wnt obitelji (engl. *Wnt family member 9B*)

WT1 – Wilmsov tumor 1 (engl. *wilms tumor 1*)

XEDAR – X-vezani receptor za ektodisplazin A2 (engl. *X-linked ectodysplasin-A2 receptor*)

1. UVOD

1.1. Anatomija bubrega

1.1.1. Građa bubrega

Bubreg (lat. *ren*, grč. *nephros*) je parni retroperitonealni organ smješten u projekciji između dvanaestog torakalnog i trećeg lumbalnog kralješka. Prosječne dimenzije odraslog bubrega iznose približno 10-12 cm u dužinu, 5-7 cm u širinu i 3-5 cm u debljinu, a njegova veličina često se uspoređuje s veličinom stisnute šake. Zbog anatomskeg položaja jetre desni bubreg obično je smješten nešto niže od lijevog, u prosjeku oko 2-3 cm (3, 4).

Na medijalnoj strani bubrega nalazi se bubrežni hilus (*hilum renale*), kroz koji prolaze bubrežna arterija (*a. renalis*), bubrežna vena (*v. renalis*) i bubrežna nakapnica (*pelvis renalis*), koja predstavlja početni dio mokraćovoda. Hilus vodi u bubrežni sinus, šupljinu unutar organa koja sadrži dijelove sabirnog sustava i masno tkivo (4, 5).

U presjeku bubrega razlikuju se vanjska kora (*cortex renalis*) i unutarnja srž (*medulla renalis*). Srž je građena od bubrežnih piramida (*pyramides renales*), čiji su vrhovi odnosno bubrežne papile (*papillae renales*) usmjereni prema bubrežnom sinusu (*sinus renalis*), a baze prema kori. U jednom bubregu obično se nalazi 5-11 piramida, a svaka piramida s pripadajućim dijelom kore čini bubrežni režanj. Između piramida u srž se pružaju kortikalni nastavci poznati kao bubrežne kolumne (*columnae renales*) (4-6). Mokraća se preko bubrežnih papila drenira u male bubrežne vrčeve (*calices renales minores*), a koji se spajaju u dva ili tri velika bubrežna vrča (*calices renales majores*) koji se potom nastavljaju u bubrežnu nakapnicu (*pelvis renalis*) (3).

Makroskopska organizacija bubrega omogućuje učinkovitu drenažu mokraće iz parenhima u sabirni sustav, koji započinje u području papila bubrežnih piramida i nastavlja se kroz bubrežne čašice i nakapnicu (4-6). Ova prostorna organizacija odražava mikroskopsku građu bubrega i temelj je njegove funkcionalne jedinice, nefrona.

1.1.2. Irigacija i inervacija

Bubrezi su izrazito dobro vaskularizirani organi koji se primarno opskrbljuju krvlju putem bubrežnih arterija (*aa. renales*), izravnih ogranaka abdominalne aorte, koje se unutar parenhima granaju u segmentne, interlobarne, lučne i intralobularne arterije (4, 5). Venska drenaža svakog bubrega ostvaruje se putem više bubrežnih vena koje se međusobno spajaju u promjenjivom anatomsom obrascu, formirajući lijevu i desnu bubrežnu venu (*v. renalis sinistra et dextra*) koje

se ulijevaju u donju šuplju venu. Iako bubrezi čine svega oko 1 % ukupne tjelesne mase, primaju približno 20 % srčanog minutnog volumena. Iz tog iznimno velikog protoka krvi (1,0-1,2 L/min), glomeruli filtriraju 90-120 mL/min, od čega se većina ponovno resorbira, što rezultira stvaranjem male količine mokraće, približno 1 mL/min (7). Veliki bubrežni protok krvi nužan je za održavanje stabilne glomerularne filtracije i homeostaze (8, 9). Unatoč značajnim varijacijama sistemskog krvnog tlaka, bubrezi posjeduju izražene mehanizme autoregulacije koji omogućuju relativno konstantan protok krvi i brzinu glomerularne filtracije (8, 10). Ova autoregulacija temelji se na miogenom odgovoru aferentnih arteriola i tubuloglomerularnoj povratnoj sprezi (8, 9). Poremećaji bubrežne perfuzije mogu brzo dovesti do ishemijskog oštećenja parenhima, osobito u području srži koja je fiziološki slabije oksigenirana (11, 12).

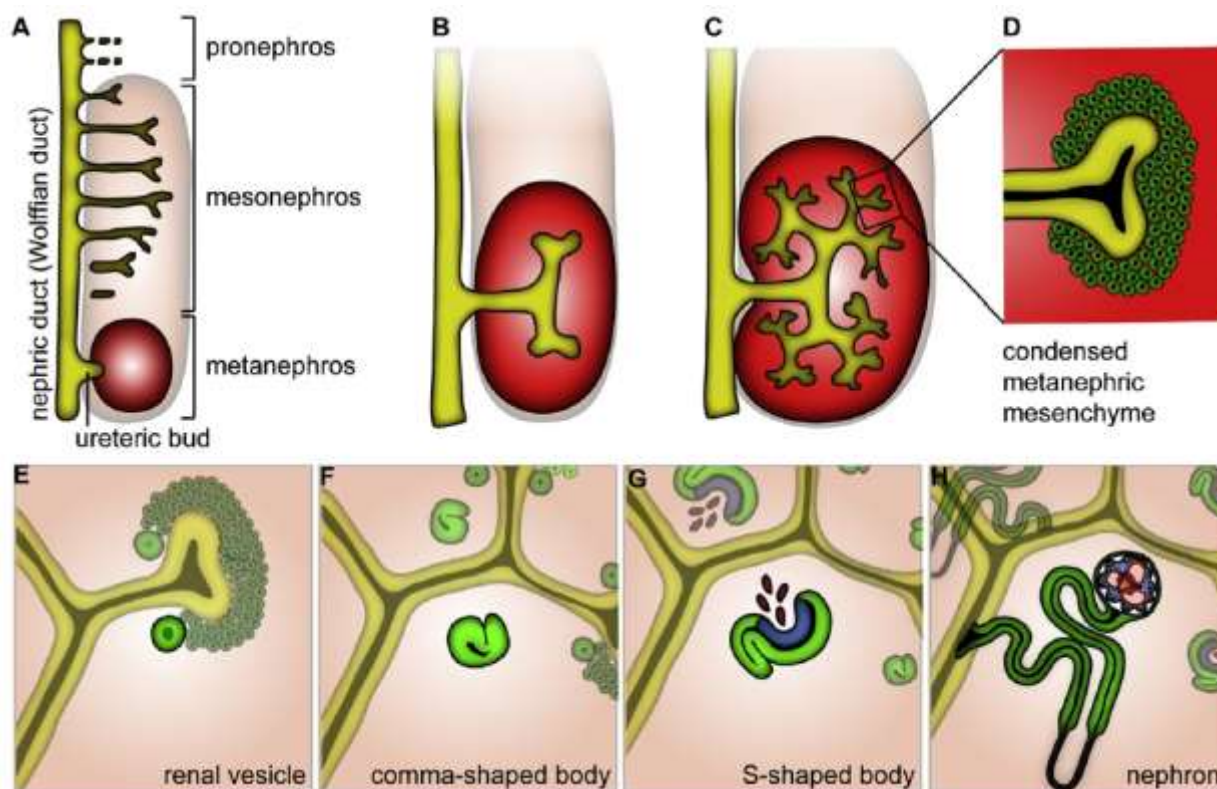
Perfuzija bubrežne kore znatno je veća od perfuzije srži, dok je medularna cirkulacija organizirana putem sustava *vasa recta*, koji omogućuje protustrujnu izmjenu nužnu za koncentracijsku sposobnost bubrega (11, 12). Protustrujni raspored silaznih i uzlaznih *vasa recta* omogućuje zadržavanje NaCl-a i ureje u intersticiju, koje u njega otpuštaju sabirni kanalići i Henleove petlje. Ovaj mehanizam ključan je za održavanje kortikomedularnog osmotskog gradijenta, ali istodobno ograničava dostavu kisika i metaboličkih supstrata medularnom tkivu (12). Ova specifična mikrovaskularna organizacija istodobno ograničava difuziju kisika, čineći bubrežnu srž sklonijom hipoksiji (11, 13). Očuvanje ravnoteže između dostave kisika i metaboličkih potreba ključno je za održavanje funkcionalnog integriteta nefrona.

Autonomna inervacija bubrega ostvaruje se putem bubrežnog živčanog spleta (*plexus renalis*) (7, 14). Simpatička vlakna prate bubrežne krvne žile te reguliraju vaskularni tonus, izlučivanje renina i tubularni transport natrija (14, 15). Pojačana simpatička aktivacija dovodi do vazokonstrikcije aferentnih arteriola i smanjenja glomerularne filtracije (14). Parasimpatička povezanost bubrega putem vagalnih vlakana opisana je u ranijim neuroanatomskim istraživanjima, iako je njezina funkcionalna uloga dugo ostala nedovoljno razjašnjena. Suvremena eksperimentalna istraživanja potvrđuju da ova komponenta sudjeluje u neuralnoj regulaciji bubrežne perfuzije i tubularne funkcije (15, 16).

1.2. Embriologija bubrega

Tijekom embrionalnog razvoja čovjeka izmjenjuju se tri generacije bubrega: pronefros, mezonefros i metanefros. Svaka uzastopna razvojna faza bubrega formira se duž prednje-stražnje

(antero-posteriorne) embrionalne osi, pri čemu svaka sljedeća struktura pokazuje veću morfološku složenost u odnosu na prethodnu (Slika 1).



Slika 1. Razvojni stadiji ljudskog bubrega. Prema Schell et. al, 2014 (17), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY-NC-ND 3.0

Pronefrosi (Slika 1A) su bilateralne, prolazne strukture koje se pojavljuju tijekom četvrtog tjedna razvoja u čovjeka i 8. embrionalnog dana (E8) u miša. Predstavljene su s nekoliko staničnih nakupina i tubularnih struktura u području razvijajućeg vrata. Razvijaju se iz nefrotoma, segmenta intermedijarnog mezoderma koji privremeno formira rudimentarnu šupljinu, nefrocel, u komunikaciji s intraembrionalnim celomom (18-20). Pronefrosi ubrzo regrediraju u viših sisavaca, dok su u riba i vodozemaca bitni za održavanje ravnoteže vode te preko trepetljika sudjeluju u transportu tekućine kroz pronefričke kanaliće (21).

Razvoj mezonefrosa (Slika 1B) započinje istodobno s regresijom pronefrosa tijekom četvrtog gestacijskog tjedna u ljudskom embriju, odnosno oko embrionalnog dana E9 u miša (18-20, 22). Mezonefros se formira u torakolumbalnoj regiji intermedijarnog mezoderma te se razvija u kraniokaudalnom smjeru. Građen je od mezonefričkog (Wolffovog) kanala i niza primitivnih

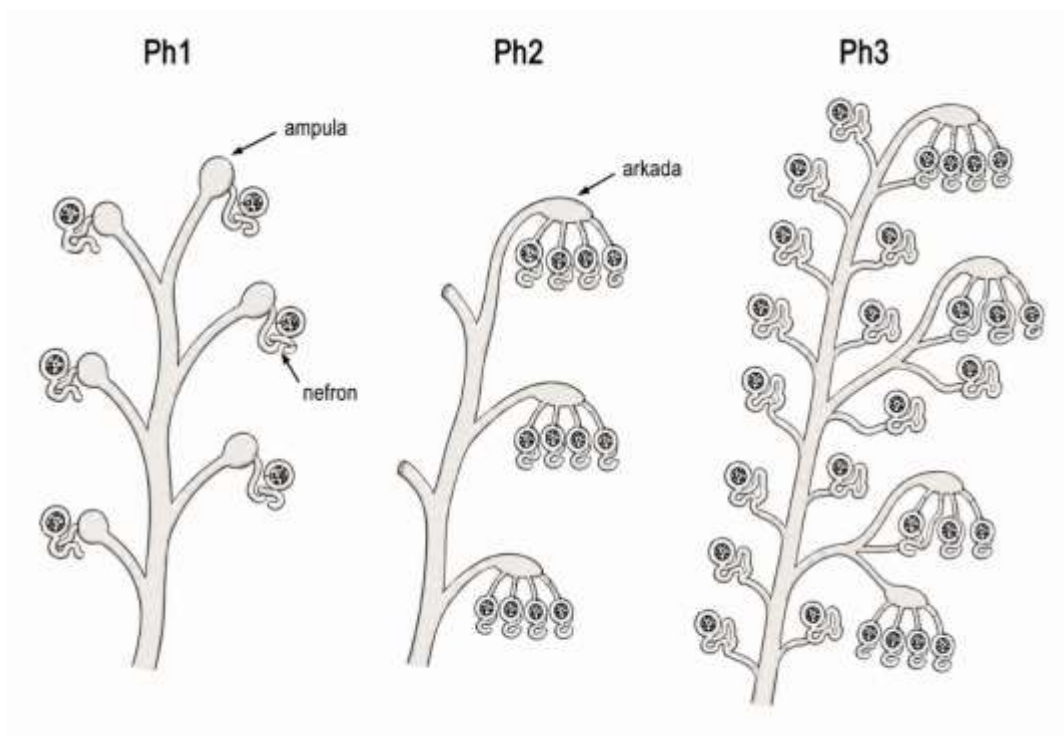
mezonefričkih nefrona, koji predstavljaju prve funkcionalne ekskretorne jedinice sposobne za ograničenu filtraciju krvi i stvaranje male količine urina između šestog i desetog tjedna ljudskog razvoja (19, 20, 22). Svaki mezonefrički nefron sastoji se od glomerula i pripadajućeg kanalića koji se ulijeva u mezonefrički kanal, pri čemu pojedini glomeruli mogu dijeliti zajednički odvodni kanalić (19, 22, 23). Na vrhuncu razvoja prisutno je približno 35-40 mezonefričkih kanalića (3). Kranijalno smješteni nefroni postupno involuiraju, prateći razvojni val regresije koji se širi od kranijalnog prema kaudalnom dijelu embrija (19, 22). Kanalići najkaudalnijih nefrona često ne uspostavljaju funkcionalnu vezu s Wolffovim kanalom te stoga ne sudjeluju u ekskretornoj aktivnosti (19). Kod čovjeka mezonefros gotovo u potpunosti nestaje do kraja trećeg mjeseca razvoja, dok u miša regredira oko embrionalnog dana E14 (18-20, 22). U ženskog embrija mezonefrički kanal i kanalići uglavnom degeneriraju, dok u muškom embriju mezonefrički kanal perzistira i sudjeluje u formiranju dijelova spolnog sustava, uključujući epididimis, sjemenovod i sjemene mjehuriće, dok dio mezonefričkih kanalića formira eferentne kanaliće testisa (19, 20). Na kaudalnom kraju mezonefričkog kanala razvija se mokraćovodni pupoljak, čime započinje razvoj trajnog bubrega, metanefrosa (19, 23).

Metanefros (Slika 1C), odnosno zametak trajnog bubrega u sisavaca, započinje svoj razvoj tijekom četvrtog do petog gestacijskog tjedna u čovjeka, odnosno oko embrionalnog dana E10.5 u miša, u razdoblju kada je mezonefros još uvijek prisutan i djelomično funkcionalan (18-20, 22). Nastaje međudjelovanjem dvaju razvojnih izvora: epitelnog mokraćovodnog pupoljka, koji izrasta iz kaudalnog dijela Wolffova kanala te metanefrogenog mezenhima podrijetlom iz intermedijarnog mezoderma (19, 20, 22).

Nakon što mokraćovodni pupoljak penetrira u metanefrogeni mezenhim, započinje proces ponavljano grananja kojim se uspostavlja temelj budućeg sabirnog sustava bubrega (22, 24). Na vrhovima granajućih ampula dolazi do lokalne kondenzacije okolnih mezenhimskih stanica, čime nastaje tzv. metanefrogena kapa, populacija progenitorskih stanica smještenih neposredno uz epitelne vrhove sabirnih kanalića (22, 24, 25). Ova struktura predstavlja rezervoar nefrogenskih prekursora i ključni je morfološki i funkcionalni element u regulaciji nefrogeneze.

Pod utjecajem signalnih interakcija između epitela mokraćovodnog pupoljka i metanefrogenog mezenhima, stanice metanefrogene kape prolaze kroz proces daljnje kondenzacije i organizacije, pri čemu nastaju pretubularni agregati (24, 25). Ti agregati predstavljaju ranu fazu

mezenhimsko-epitelne transformacije (MET) i prethode formiranju epitelnih struktura budućeg nefrona. Pretubularni agregati postupno se epiteliziraju i diferenciraju u bubrežne mjehuriće, koji zatim prolaze kroz stadije kanalića u obliku zareza i kanalića u obliku slova „S“, čime započinje morfološka diferencijacija pojedinih segmenata nefrona (19, 23, 24). Razvoj metanefrosa može se podijeliti u četiri faze, ovisno o obrascu grananja mokraćovodnog pupoljka i njegovoj sposobnosti induciranja nastanka nefrona (Slika 2). U prvoj fazi (Ph1), koja traje od 5. do približno 14. tjedna gestacije, svaki vrh granajućeg pupoljka (lat. *ampullae*) inducira stvaranje jednog nefrona. Tijekom druge faze (Ph2), od oko 15. do 20.-22. tjedna, grananje mokraćovodnog stabla postupno se usporava, dok pojedini vrhovi induciraju formiranje više nefrona koji se povezuju u arkadne strukture. Treća faza (Ph3), koja traje do 34.-36. tjedna razvoja, predstavlja razdoblje najintenzivnije nefrogeneze; tada se formira najveći broj nefrona, a novi nefroni se zasebno priključuju duž sabirnih kanalića. Četvrta faza (Ph4) započinje oko 36. tjedna i nastavlja se postnatalno, pri čemu vrhovi sabirnih kanalića nestaju, ne dolazi do stvaranja novih nefrona, a postojeći nefroni prolaze kroz završne faze sazrijevanja (23, 25).



Slika 2. Shematski prikaz grananja ampula u prvoj (Ph1), drugoj (Ph2) i trećoj (Ph3) bubrežnoj razvojnoj fazi. Izvor: autorica.

Iz različitih segmenata tih struktura razvijaju se pojedini dijelovi nefrona: distalni segment daje distalni zavijeni kanalić, srednji segment diferencira se u proksimalne dijelove i Henleovu petlju, dok se iz proksimalnog dijela formira Bowmanova čahura (18-20, 22). Tijekom formiranja glomerula visceralni list Bowmanove čahure diferencira se u podocyte, dok parijetalni list tvori parijetalne epitelne stanice. Distalni dio nefrona uspostavlja vezu sa sabirnim kanalićem, čime se formira funkcionalno zatvorena jedinica sposobna za filtraciju i obradu primarnog urina (19, 23, 25).

Morfogeneza nefrona nije izoliran proces, već je od najranijih stadija usko povezana s razvojem bubrežne vaskularne mreže. Razvoj glomerularnog kapilarnog pleksusa započinje kada endotelni prekursori migriraju u proksimalni rascjep nezrelog, epitelom obloženog kanalića u obliku slova „S“. Epitelne stanice koje oblažu taj rascjep predstavljaju prekursore podocita te luče vaskularni endotelni čimbenik rasta A (engl. *vascular endothelial growth factor A*, VEGFA), čime privlače endotelne prekursore. Rascjep se postupno proširuje te nastaje jedna kapilarna petlja. Ta pojedinačna kapilarna petlja potom prolazi kroz intenzivno grananje i formiranje novih petlji, stvarajući kapilarni pleksus s jednim ulazom (aferentna arteriola) i jednim izlazom (eferentna arteriola) na jednom polu kapilarnog klupka (26, 27).

Zaključno, razvoj metanefrosa predstavlja dinamičan i precizno reguliran proces u kojem sinkronizirana interakcija mokraćovodnog epitela, nefrogenog mezenhima i vaskularnih prekursora određuje konačan broj, strukturu i funkcionalnu zrelost nefrona.

1.3. Molekularni mehanizmi razvoja bubrega

Razvoj metanefrosa rezultat je intenzivne i vremenski precizno regulirane interakcije epitela i mezenhima. Središnje mjesto u inicijaciji grananja mokraćovodnog pupoljka zauzima signalni put neurotrofnog čimbenika rasta koji potječe iz glija stanica (engl. *glial cell line-derived neurotrophic factor*, GDNF) i receptora RET (engl. *REarranged during transfection*) (28, 29). Gubitak funkcije GDNF-a ili bilo koje komponente njegova receptorskog kompleksa dovodi do potpune renalne ageneze ili teške hipoplazije bubrega u mišjih embrija, što jasno ukazuje na njegovu esencijalnu ulogu u ranoj nefrogenezi (30-32). GDNF se eksprimira u metanefrogenom mezenhimu, dok se receptor tirozin-kinaza RET i koreceptor alfa-1 obitelji GDNF (engl. *GDNF family receptor alpha 1*, GFR α) inicijalno nalaze u epitelu Wolffova kanala, a potom se njihova ekspresija ograničava na vrhove mokraćovodnog pupoljka gdje kontroliraju proces ponavljano

grananja (33). Aktivacija RET-a ne predstavlja izolirani događaj, već pokreće više intracelularnih signalnih kaskada, uključujući signalni put mitogenom aktivirane protein-kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i izvanstaničnim signalom regulirane kinaze (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK), kao i signalni put fosfatidilinozitol-3-kinaze (engl. *phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) i protein-kinaze B (engl. *protein kinase B*, AKT), koji reguliraju proliferaciju i morfološko modeliranje epitela (29). Istodobno, epitel mokraćovodnog pupoljka i okolni mezenhim razmjenjuju brojne dodatne signalne molekule, čime se uspostavlja dvosmjerni komunikacijski sustav nužan za pravilno odvijanje morfogeneze (28, 29). Ovakva organizacija signalizacije omogućuje fino podešavanje prostornog obrasca grananja.

Sposobnost metanefrogenog mezenhima da odgovori na ove induksijske podražaje ovisi o ekspresiji transkripcijskog čimbenika WT1 (engl. *Wilms tumor 1*), koji održava diferencijacijsku kompetentnost progenitorskih stanica i regulira ekspresiju GDNF-a. U tom kontekstu WT1 djeluje kao čuvar nefrogene populacije, povezujući održavanje mezenhima s aktivacijom epitelnog grananja (23). Nakon uspostave osnovnog obrasca grananja, mokraćovodni pupoljak djeluje i na održavanje populacije nefrogenih progenitora. Fibroblastni čimbenik rasta 2 (engl. *fibroblast growth factor*, FGF2) i koštani morfogenetski protein 7 (engl. *bone morphogenetic protein 7*, BMP7) sprječavaju apoptozu te potiču proliferaciju metanefrogenog mezenhima (34, 35). Ovi čimbenici ne induciraju izravno epitelizaciju, ali osiguravaju da mezenhimske stanice ostanu vitalne i sposobne za daljnju diferencijaciju. Važno je naglasiti da proces grananja nije isključivo stimuliran aktivacijskim signalima; njegovo prostorno ograničenje osiguravaju i inhibicijski mehanizmi, poput BMP4 i negativnog regulatora RET signalizacije SPRY1 (engl. *Sprouty1*), koji sprječavaju ektopično ili nekontrolirano grananje (23).

Ključni korak u nastanku nefrona predstavlja mezenhimsko-epitelna transformacija. Ona je posredovana signalima mokraćovodnog pupoljka, osobito putem WNT9B (engl. *Wnt family member 9B*) i WNT6 (engl. *Wnt family member 6*), koji u metanefrogenom mezenhimu induciraju ekspresiju gena *PAX2* (engl. *paired box gene 2*) i *WNT4* (engl. *Wnt family member 4*) (36–39). *PAX2* doprinosi kondenzaciji i organizaciji nefrogenog mezenhima, stvarajući morfološku podlogu za nastanak pretubularnih agregata, dok je *WNT4* nužan za epitelizaciju kondenziranog mezenhima i formiranje epitelnih tubularnih struktura (37, 38). Bez *WNT4*, proces MET-a se ne odvija, što potvrđuje njegovu ključnu ulogu u ranoj fazi diferencijacije nefrona (38, 39).

Tijekom ovog procesa dolazi i do promjena u sastavu izvanstaničnog matriksa te reorganizacije staničnih adhezijskih molekula, čime se mezenhimski fenotip postupno zamjenjuje epitelijalnim. Navedeni događaji ne odvijaju se izolirano, već su rezultat koordinirane aktivnosti više signalnih mreža koje djeluju u strogo definiranim vremenskim i prostornim okvirima.

U konačnici, razvoj metanefrosa može se promatrati kao dinamička ravnoteža između proliferacijskih, diferencijacijskih i inhibitornih signala. Stabilnost te ravnoteže presudna je za pravilno formiranje nefrona i sabirnog sustava, a njezin poremećaj može rezultirati razvojnim anomalijama bubrega.

1.4. Usporedba mikroskopske građe bubrega miša i čovjeka

Organogeneza bubrega u sisavaca visoko je konzervirana, kako na anatomskej tako i na molekularnoj razini. Stoga se u istraživanjima ovog procesa uvelike koriste modelni organizmi, ponajprije miš i štakor (40). Bubrež miša, kao i humani bubrež, razvija se iz metanefričkog primordija, histološki je organiziran u koru i srž, a nefron kao osnovna funkcionalna jedinica sastoji se od glomerula, proksimalnog i distalnog tubula, Henleove petlje i sabirnog sustava (41). Broj nefrona prisutnih u jednom bubregu značajno varira između vrsta te iznosi približno od 11 000 do 19 000 u miša, odnosno od 200 000 do 1,8 milijuna u čovjeka (42, 43).

Unatoč znatnoj razlici u veličini, bubrež miša pokazuje visok stupanj morfološke podudarnosti s humanim bubregom. Makroskopski, mišji bubrež je unipapilarni organ, posjeduje jednu renalnu papilu koja se drenira u jednu čašicu i nakapnicu, dok humani bubrež ima multipapilarnu građu s 8 do 18 renalnih papila (41, 44). Kortikalna zona mišjeg bubrega sadrži glomerule i vijugave tubule, dok medularnu zonu građe ravni segmenti tubula i sabirni kanali koji konvergiraju prema papili. Henleova petlja miša proporcionalno je dulja u odnosu na veličinu bubrega nego u čovjeka, s izraženim tankim segmentima koji doprinose visokom omjeru duljine petlje i volumena bubrega. Ova morfološka organizacija povezana je s većom koncentracijskom sposobnošću urina koja u miša može doseći približno 4 000 mOsm/kg H₂O, dok u čovjeka iznosi oko 1200-1400 mOsm/kg H₂O (44, 45).

Mikroskopska građa bubrega u obje vrste temelji se na organizaciji nefrona i sabirnog sustava. U kori se nalaze bubrežna tjelešca i vijugavi dijelovi tubula, dok se u srži bubrega nalaze ravni segmenti nefrona i sabirni kanali. Bubrežno tjelešce sastoji se od glomerularnog kapilarnog

klupka okruženog Bowmanovom čahurom. Kapilarna mreža glomerula stabilizirana je intraglomerularnim mezangijskim stanicama koje su uronjene u mezangijski izvanstanični matriks. Ove stanice imaju važnu ulogu u održavanju strukture glomerula, fagocitozi i uklanjanju makromolekula iz filtracijske barijere te sintezi komponenti međustaničnog matriksa. Mezangijske stanice također posjeduju kontraktilna svojstva koja omogućuju regulaciju promjera kapilarnih petlji i time utječu na glomerularni protok krvi i filtraciju (41, 46, 47).

Na ultrastrukturnoj razini glomerularna bazalna membrana u miša histološki odgovara humanoj po sastavu ključnih komponenti izvanstaničnog matriksa, uključujući kolagen tipa IV, laminin i nidogen (47, 48). Nožice podocita i filtracijska dijafragma (engl. *slit diaphragm*) morfološki su i molekularno očuvani, a ključni proteini poput nefrina, podocina i CD2AP (engl. *CD2-associated protein*) izraženi su u objema vrstama (49, 50). Proksimalni tubuli miša obloženi su kubičnim epitelom bogatim mitohondrijima i karakterizirani izraženom četkastom prevlakom (engl. *brush border*), što odražava intenzivnu reapsorpcijsku aktivnost. Histološki i funkcionalno u velikoj su mjeri usporedivi s humanim proksimalnim tubulima, iako je relativni volumen tubularnih stanica nešto manji zbog kompaktnije organizacije korteksa (51, 52). Distalni tubul u obje vrste karakterizira kubični epitel bez četkaste prevlake, s izraženim bazolateralnim invaginacijama plazmatske membrane koje odražavaju visoku aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze i aktivnu ionsku reapsorpciju (52, 53). Važno obilježje koje razlikuje mišji bubreg od humanog jest organizacija jukstaglomerularnog aparata. Premda su renin-pozitivne jukstaglomerularne stanice, stanice macula densa i ekstraglomerularne mezangijeske stanice morfološki prisutne u objema vrstama, gustoća renin-pozitivnih stanica i opseg njihove regrutacije duž aferentne arteriole u miša su znatno veći, što upućuje na fiziološki različit kapacitet renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (54, 55). Intersticij mišjeg bubrega histološki je oskudan, s relativno malim brojem intersticijskih fibroblasta i malom količinom izvanstaničnog matriksa u fiziološkim uvjetima, što je potrebno uzeti u obzir pri interpretaciji procesa fibrogeneze u patološkim modelima (56). Sve navedene sličnosti i razlike od ključne su važnosti pri prijenosu nalaza s mišjeg modela na humanu patologiju. Visoka konzerviranost signalnih putova i stanične kompozicije nefrona opravdava primjenu transgeničnih i knockout mišjih modela u istraživanjima razvojnih anomalija bubrega i mokraćnog sustava u čovjeka. Međutim, morfološke i kvantitativne razlike, posebice u broju nefrona, građi papile i debljini glomerularne bazalne membrane potrebno je uzeti u obzir pri interpretaciji fenotipskih podataka i ekstrapolaciji nalaza na humane bolesti (44, 48).

1.4.1. Signalni put Reelin–DAB1 i *yotari* (*Dab1*⁷⁷) mišji model

Disabled-1 (DAB1) unutarstanični je adaptorski protein čija fosfotirozin-vezujuća (PTB) domena posreduje prijenos signala nizvodno od reelina, velikog izvanstaničnog glikoproteina koji djeluje kao ključni regulator stanične organizacije tijekom razvoja (57, 58). Reelin i DAB1 evolucijski su visoko konzervirani i tradicionalno se proučavaju u kontekstu razvoja živčanog sustava, no sve je više dokaza da njihova funkcija nadilazi granice neurološkog sustava (58, 59).

Gen *RELN*, smješten na kromosomu 7q22 u čovjeka, odnosno kromosomu 5 u miša, kodira glikoprotein molekularne mase oko 440 kDa (60, 61). Strukturno, reelin sadrži signalni peptid, domenu homolognu F-spondinu, osam ponavljajućih domena specifičnih za reelin (RR1-RR8)-svaka podijeljena na poddomene A i B s umetnutom EGF-sličnom domenom te kratki pozitivno nabijeni C-terminalni slijed (58, 62). Središnja regija proteina, konkretno domene RR5-RR6, odgovorna je za vezanje na receptore (58, 62). Tijekom embrionalnog razvoja, reelin pretežno sintetiziraju Cajal-Retziusove stanice marginalne zone moždane kore i hipokampusa te prekursori granularnih stanica u vanjskom granularnom sloju malog mozga (61, 63). S postnatalnim sazrijevanjem dolazi do pomaka izvora pa tako u odraslom mozgu reelin uglavnom produciraju GABAergički interneuroni kortikalne ploče, cerebelarne granularne stanice i hipokampalni interneuroni (58, 64). Važno je napomenuti da se reelin nakon sekrecije proteolitički cijepa na tri veća fragmenta, no funkcionalna uloga tog cijepanja još nije jasno definirana (58).

U kanonskom signalnom putu, Reelin se u obliku oligomera veže na dva receptora iz obitelji receptora za lipoproteine niske gustoće - apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2/LRP8) i receptor za lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDLR), čime inducira klasterizaciju receptorskih kompleksa (65, 66). Signal se prenosi putem adaptor proteina DAB1, koji stupa u interakciju s citoplazmatskim repom receptora (57, 66). Fosforilirani DAB1 regrutira proteine koji sadrže SH2 domenu te aktivira nizvodne signalne kaskade, uključujući fosfatidilinozitol-3-kinazu (PI3K/AKT/mTOR), proto-onkogen C (CRK/CRKL–RAP1) i mitogenom aktiviranu protein-kinazu/ekstracelularnim signalima reguliranu kinazu (MEK/ERK1/2) putove, koji reguliraju dinamiku citoskeleta, staničnu migraciju, preživljavanje i diferencijaciju (67, 68).

Yotari predstavlja mutantni mišji model s neurološkim poremećajem čija se mutacija nasljeđuje autosomno recesivno. Fenotipske karakteristike *yotari* miševa uvelike nalikuju onima opaženima kod *reeler* mutanta. Životinje se mogu prepoznati po nestabilnom hodu i izraženom

tremoru, a često ugibaju u ranom postnatalnom razdoblju, približno tijekom perioda dojenja, između P20 i P30 (69, 70). U homozigotnih *yotari* jedinki mali mozak je hipoplastičan i ne pokazuje normalnu folijaciju. Iako se mogu prepoznati molekularni i granularni sloj malog mozga, Purkinjeove stanice nisu pravilno raspoređene, već su raspršene unutar granularnog sloja i bijele tvari. Slični poremećaji u organizaciji slojeva prisutni su i u moždanoj kori te u hipokampalnoj formaciji, gdje je normalna laminarna struktura značajno narušena (69, 70).

Osim svoje dobro poznate uloge u regulaciji neuronalne migracije, signalni put Reelin-DAB1 u posljednje se vrijeme sve češće dovodi u vezu s patogeneom neuropsihijatrijskih poremećaja. Naime, miševi s inaktiviranim *Dab1* genom pokazuju izražene poremećaje ponašanja i organizacije moždane kore koji u velikoj mjeri nalikuju promjenama zabilježenima u neurorazvojnim poremećajima, uključujući shizofreniju i poremećaje iz spektra autizma (71-73). U skladu s tim, analize humanog postmortalnog moždanog tkiva ukazuju na sniženu razinu DAB1 mRNA u određenim regijama mozga osoba s autizmom, dok je smanjena ekspresija reelina dosljedno opisana u prefrontalnom korteksu, hipokampusu i malom mozgu bolesnika sa shizofrenijom (71, 72). Zanimljivo, dio tih promjena povezuje se s epigenetskim mehanizmima, osobito hipermetilacijom promotora gena *RELN* (74). Dodatnu potporu toj povezanosti pruža i heterozigotni *reeler* model, koji pokazuje približno smanjenje razine Reelina za 50 % te reproducira pojedine kognitivne i senzorne deficite karakteristične za shizofreniju (75).

Ipak, funkcija DAB1 proteina očito nije ograničena isključivo na živčani sustav. Primjerice, njegova ekspresija u endotelnim stanicama povezuje se s formiranjem krvno-moždane barijere i uspostavljanjem fine neurovaskularne komunikacije (76). Osim toga, sve je više dokaza koji upućuju na njegovu potencijalnu ulogu u tumorskoj biologiji. Smanjena ekspresija DAB1 opisana je u karcinomu dojke, gdje se povezuje s deregulacijom signalnih putova uključenih u apoptozu, dok eksperimentalno povećanje njegove ekspresije u stanicama raka prostate dovodi do smanjenja njihove migracije i invazivnosti, što sugerira moguću tumor-supresorsku funkciju (77, 78).

U tom širem kontekstu postaje sve jasnije da se djelovanje Reelin-DAB1 signalnog puta ne može promatrati isključivo kroz prizmu neurobiologije. Novija istraživanja ukazuju na njegovu ulogu i u razvoju bubrega te potencijalnu povezanost s kongenitalnim anomalijama bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT). Analize humanog fetalnog bubrežnog tkiva pokazale su da DAB1

i Reelin imaju specifičan prostorno-vremenski obrazac ekspresije tijekom razvoja, pri čemu je DAB1 izraženiji u tubularnim strukturama, dok je Reelin dominantnije prisutan u ranijim razvojnim stadijima (79). Dodatno, *yotari* mišji model, obilježen inaktivacijom *Dab1* gena, pokazuje razvoj renalne hipoplazije i strukturne promjene glomerula, osobito na razini podocita, što upućuje na važnu ulogu ovog signalnog puta u pravilnoj nefrogenezi (79). Iako su molekularni mehanizmi još uvijek nedovoljno razjašnjeni, ovi nalazi sugeriraju da poremećaj Reelin-DAB1 signalizacije može pridonijeti nastanku CAKUT fenotipova te otvaraju prostor za daljnja translacijska istraživanja u području razvojne nefrologije.

1.5. Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT)

Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT) obuhvaćaju heterogenu skupinu strukturnih malformacija koje zahvaćaju bubrege, mokraćovode, mokraćni mjehur i mokraćnu cijev (80, 81). Ove anomalije predstavljaju najčešći uzrok kronične bubrežne insuficijencije u pedijatrijskoj populaciji, s procijenjenom prevalencijom u rasponu od 4 do 60 na 10 000 živorođene djece (82, 83). Ukupna incidencija CAKUT-a iznosi trećinu slučajeva od ukupnog broja svih kongenitalnih anomalija, čime se svrstava među najčešće kongenitalne malformacije, odmah nakon srčanih anomalija i genetskih sindroma (84). Klinički spektar ovih anomalija izrazito je širok te obuhvaća izolirane defekte kao i one koji se javljaju u sklopu sindromskih entiteta, a nerijetko dovodi do završnog stadija bubrežnog zatajenja (85, 86). Prema podacima Europskog registra za djecu na nadomjesnoj bubrežnoj terapiji (ESPN/ERA) iz 2019. godine, CAKUT je identificiran kao vodeći uzrok kronične bubrežne bolesti u 30 do 60 % djece na nadomjesnoj bubrežnoj terapiji (87, 89). Prema smjernicama EUROCAT-a iz 2024. godine, CAKUT se dijeli u osam podskupina, a uključuje jednostranu i obostranu renalnu ageneziju, multicističnu displaziju bubrega, kongenitalnu hidronefrozu i opstrukciju mokraćovoda, ektopične bubrege, ekstrofiju mokraćnog mjehura i epispadiju, posteriorne uretralne valvule te sindrom mlohavog trbuha (engl. *prune belly syndrome*) (89).

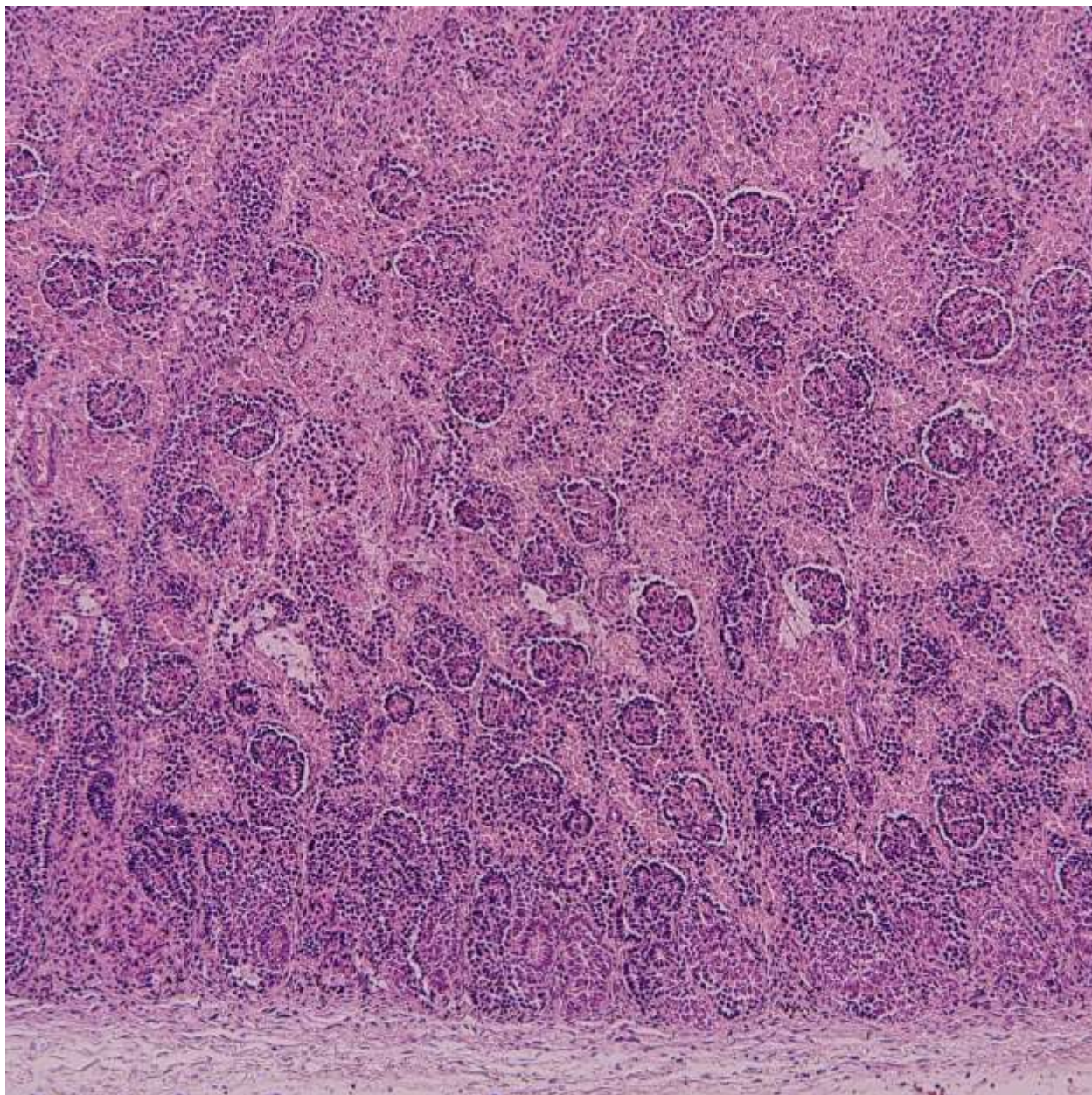
1.5.1. Fenotipovi prirođenih anomalija bubrega i mokraćnog sustava

1.5.1.1. Hipoplazija bubrega

Renalna hipoplazija definira se kao prirođeno smanjen bubreg čija je histološka građa uredna, ali je broj nefrona reduciran (90). Ključni dijagnostički kriterij jest volumen bubrega manji od dvije standardne devijacije ispod očekivane srednje vrijednosti za dob i tjelesnu veličinu, uz

očuvanu kortikomedularnu diferencijaciju i odsutnost displastičnih elemenata (Slika 3) (91). Postoje četiri podtipa renalne hipoplazije. Prvi podtip je jednostavna hipoplazija, u starijoj je literaturi opisivana terminima poput „patuljastog bubrega” (engl. *dwarf kidney*) ili “minijaturnog bubrega” (engl. *miniature kidney*) (92). Dijagnostičke kriterije za jednostavnu hipoplaziju definirali su Rubenstein i sur. 1961. godine kao stanje u kojem jedan bubreg ima masu $\leq 50\%$ očekivane, odnosno, ako su oba bubrega smanjena, njihova ukupna masa iznosi $< 33\%$ očekivane vrijednosti, pri čemu su nefroni morfološki uredni, ali brojčano reducirani (93). Oligomeganefronija, teški je oblik u kojem je broj nefrona reduciran i do 80% , dok su preostali nefroni hipertrofični, s glomerulima koji mogu doseći 12 do 15 puta veći volumen od normalnoga (92, 94).

Jedan od podtipova je i segmentalna hipoplazija (Ask-Upmarkov bubreg), ranije smatrana razvojnom anomalijom, dok se danas uglavnom smatra posljedicom stečenog oštećenja povezanog s vezikoureteralnim refluksom, u 70 do 80% slučajeva, uz izraženu predominaciju ženskog spola (72% slučajeva) (90, 92). Posljednji podtip je kortikalna hipoplazija koja vjerojatno predstavlja prijevremeni prestanak ili zastoj nefrogeneze, što rezultira manjim brojem generacija nefrona od uobičajenoga, a posljedično i manjom ukupnom veličinom bubrega (90, 92).

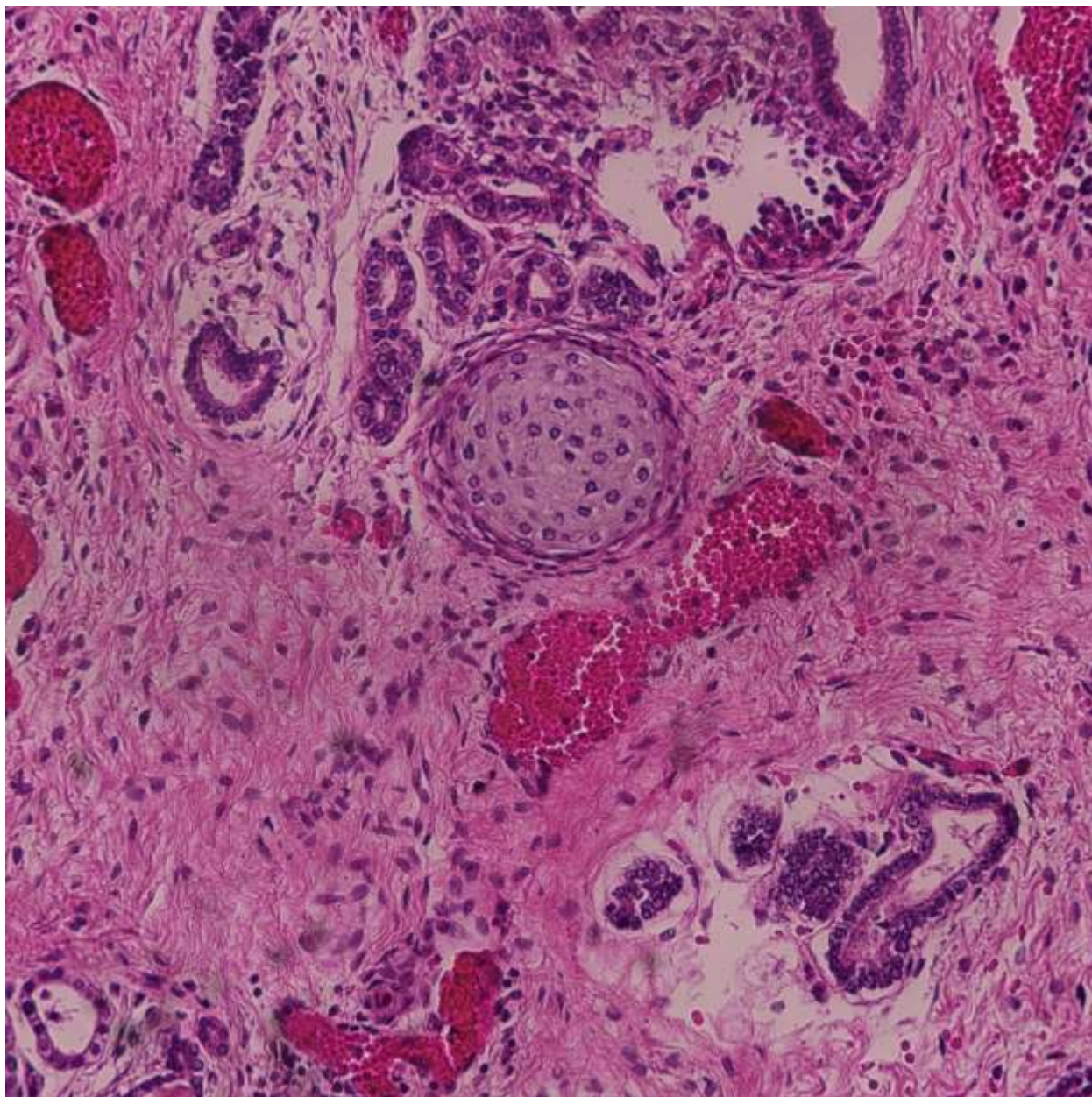


Slika 3. Svjetlosnomikroskopska analiza hipoplastičnog bubrega. Bubrezi s potvrđenom hipoplazijom zadržavaju normalnu kortiko-medularnu arhitekturu, ali su smanjene veličine, s manjim brojem nefrona i bubrežnih vršnih struktura u usporedbi s normalnim bubregom. Bubrežna kora je stanjena, s vidljivim zastojem u migraciji glomerula prema unutarnjim slojevima kore. Nisu uočene ciste, atrofirani kanali niti druga displastična obilježja. Preparat prikazan na fotografiji potječe iz arhiviranog uzorka humanog bubrega u 30. tjednu fetalnog razvoja, a snimka je snimljena pri uvećanju $\times 10$. Izvor: autorica.

Klinički, jednostrana hipoplazija može biti asimptomatska te slučajno otkrivena ultrazvučnim pregledom ili tijekom dijagnostičke obrade infekcije mokraćnog sustava, dok obostrana hipoplazija dovodi do glomerularne hiperfiltracije, hipertenzije, proteinurije i progresivnog gubitka bubrežne funkcije. Oligomeganefronija je u tom pogledu posebno nepovoljna jer u tom slučaju nastaje sekundarna fokalna segmentalna glomeruloskleroza kao adaptivni odgovor preostalih nefrona na preopterećenje (92, 95, 96). Etiologija hipoplazije uključuje mutacije u razvojnim genima (*HNF1B*, *PAX2*, *PBX1*), ali i okolišne čimbenike poput intrauterinog zastoja rasta, gestacijskog dijabetesa, izloženosti ACE inhibitorima i nedostatka vitamina A (97, 98).

1.5.1.2. Displazija bubrega

Bubrežna displazija obuhvaća skup razvojnih poremećaja u kojima inicijalno dolazi do formiranja bubrega, ali daljnja diferencijacija u funkcionalne nefrone i sabirne kanaliće izostaje ili je značajno poremećena. U patogenezi su predložena dva glavna mehanizma i to primarni poremećaj aktivnosti mokraćovodnog pupoljka te sekundarni učinak uzrokovan opstrukcijom i posljedičnim poremećajem fetalnog protoka mokraće. Novija istraživanja dodatno ukazuju na disregulaciju ekspresije gena u displastičnom bubrežnom tkivu, što je povezano s narušenom ravnotežom između stanične proliferacije, diferencijacije i apoptotskih procesa (99). Patohistološki, displastični bubreg karakterizira prisutnost primitivnih duktusa koji predstavljaju ogranke mokraćovodnog pupoljka. Ovi duktusi okruglog su do ovalnog oblika, obloženi pretežno visokim cilindričnim ili kuboidnim epitelom, a pojavljuju se pojedinačno ili u malim skupinama unutar ograničenih lobula vretenastih mezenhimalnih stanica. Nezreli mezenhim tvori karakterističan fibromuskularni ovoj vretenastih stanica raspoređenih kružno oko primitivnih duktusa, dajući nodularni izgled kompleksu duktus-mezenhim (100). Ciste različitih veličina redovito su prisutne, dok lobarna dezorganizacija, koja se očituje poremećajem normalnog kortikomedularnog odnosa, predstavlja važno morfološko obilježje bubrežne displazije. U pojedinim slučajevima nalaze se otočići zrele i nezrele hrskavice, pretežno u kortikalnom području. Dodatni nalazi uključuju ekstrapedularnu hematopoezu, pretežno u medularnom području i oko displastičnih glomerula, te snopove nemijeliniziranih živčanih vlakana uklopljenih u mezenhim (Slika 4) (100).



Slika 4. Svjetlosnomikroskopska analiza cističnog displastičnog bubrega. Displastični bubreg karakterizira nepravilni razvoj i grananje sabirnih kanalića, gubitak funkcionalnih nefrona te stvaranje aberantnih struktura, uključujući displastične kanale i ciste nastale iz primitivnih kanalića, uz zadebljanje strome i proliferaciju tkiva hrskavice. Brojne tanke ciste su razasute po bubrežnom parenhimu. Displastični tubuli s nepravilnim rubovima dominiraju u vanjskoj kori i okruženi su prstenovima nediferenciranog mezenhima, nalik glatkom mišiću, u kojem se mogu pronaći heterotopični otoci i hrskavica. Preparat prikazan na fotografiji potječe iz arhiviranog

uzorka humanog bubrega u 27. tjednu fetalnog razvoja, a snimka je izvršena pri uvećanju $\times 20$.
Izvor: autorica.

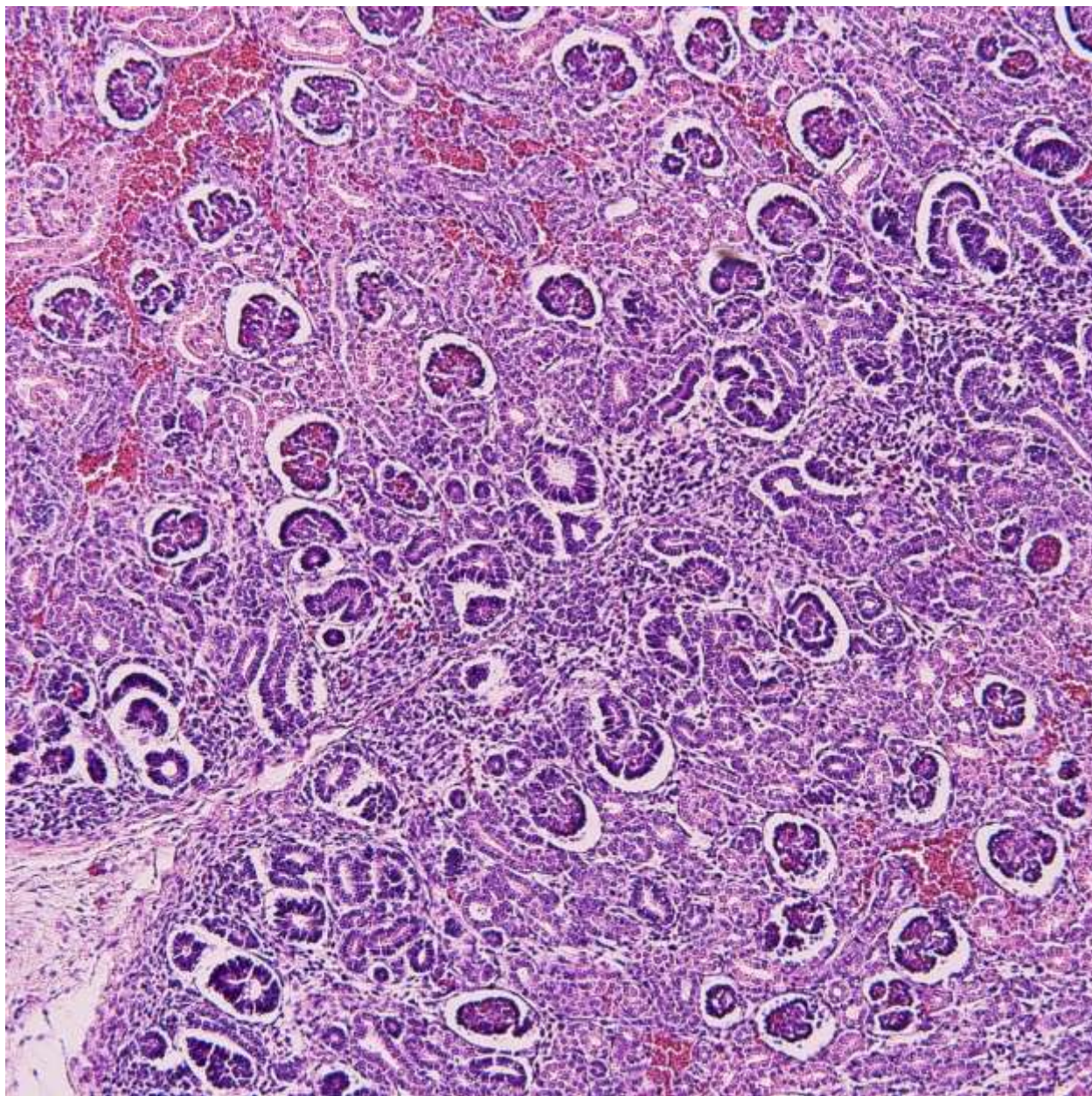
1.5.1.3. Udvostručeni ureter

Udvostručeni ureter (lat. *ureter duplex*) predstavlja jednu od najčešćih prirođenih anomalija mokraćnog sustava, s višom učestalošću u žena (101). Anomalija se može javiti unilateralno ili bilateralno, a napredak ultrazvučne dijagnostike omogućio je sve raniju prenatalnu detekciju (102).

Embriološki, ova anomalija nastaje kao posljedica preranog grananja mokraćovodnog pupoljka ili razvoja dvaju zasebnih mokraćovodnih pupoljaka iz Wolffovog kanala tijekom četvrtog do šestog tjedna embrionalnog razvoja (101, 103). Recipročne interakcije između mokraćovodnog pupoljka i metanefričkog mezenhima, regulirane signalnim putevima GDNF/RET, PAX2, SALL1 i β -kateninom, ključne su za pravilno odvijanje nefrogeneze, a poremećaji u tim putevima mogu rezultirati nastankom dupliciranih pijelokalicealnih sustava (97, 104).

Ovisno o stupnju razdvajanja, razlikujemo inkompletnu duplikaciju (*ureter bifidus* ili *ureter fissus*), kod koje se dva uretera spajaju prije ulaska u mokraćni mjehur, i kompletnu duplikaciju (*ureter duplex*), kod koje svaki ureter ima zasebno ušće (101, 105, 106). Makroskopski, udvostručeni sustav obuhvaća dva odvojena pijelokaliksna sustava unutar istog bubrežnog parenhima, pri čemu gornji pol bubrega obično drenira ureter čije ušće leži kaudalnije i medijalnije u odnosu na ušće uretera donjeg pola, sukladno Weigert-Meyerovu pravilu (107, 108). Komplikacije povezane s gornjim polom uključuju ureterokelu i opstrukciju zbog ektopične insercije, dok je donji pol skloniji vezikoureteralnom refluksu zbog kraćeg intravezikalnog tunela (109, 110).

Histopatološki, parenhim zahvaćenog pola može pokazivati različite stupnjeve displazije, osobito ako postoji pridružena opstrukcija ili refluks (111). Ureterokela, koja se javlja u značajnom broju prenatalno dijagnosticiranih dupleks sustava s komplikacijama, histološki se prikazuje kao cistična dilatacija intravezikalnog segmenta uretera obložena prijelaznim epitelom s tankim slojem glatkog mišićja u stijenci (112).



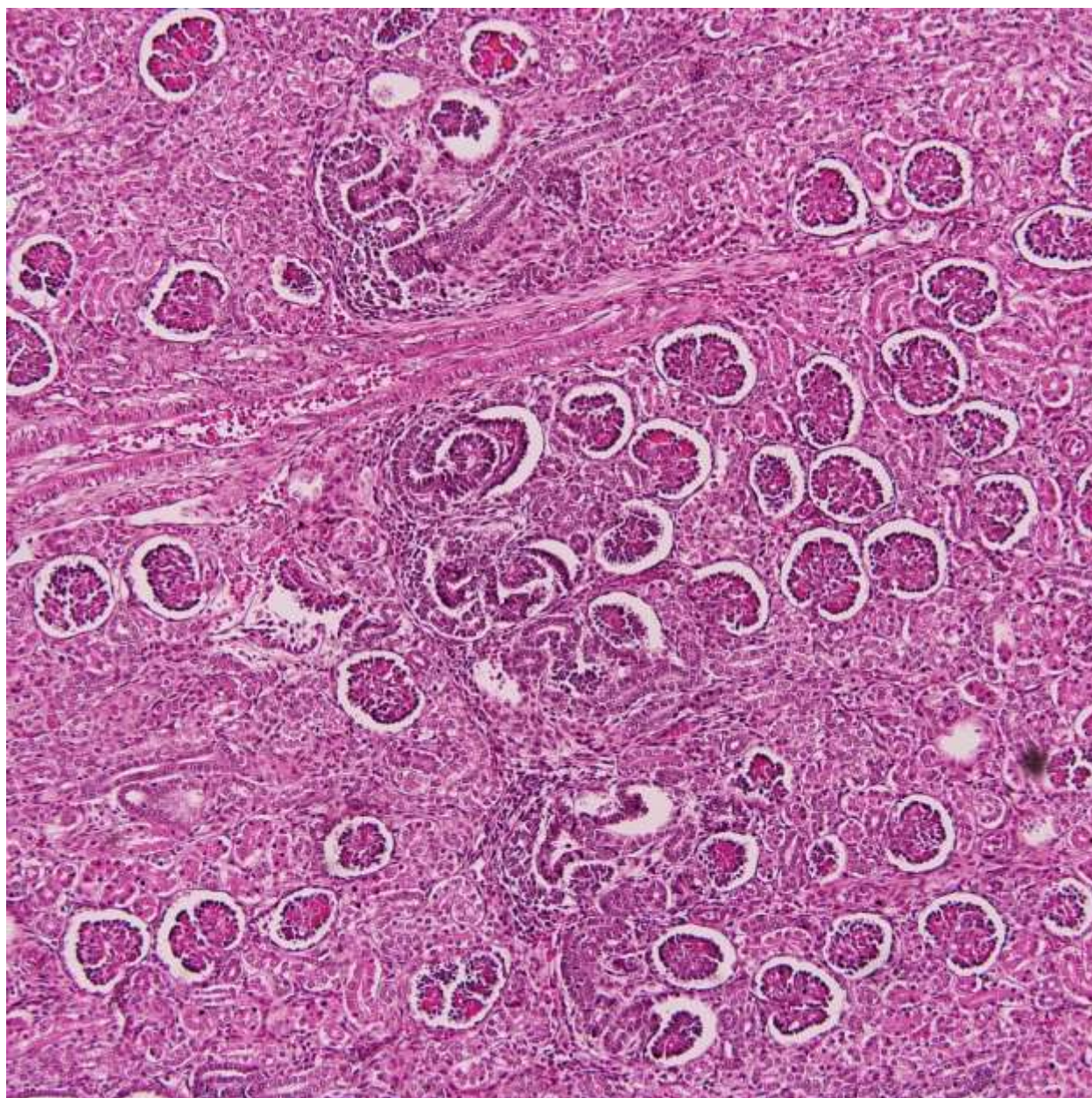
Slika 5. Svjetlosnomikroskopska analiza bubrega s udvostručenim ureterom u 24. tjednu fetalnog razvoja. Bubrežna jedinica sastoji se od dva pelvikalicealna sustava, ali zadržava normalnu histološku arhitekturu. Preparat prikazan na fotografiji potječe iz arhiviranog uzorka humanog bubrega u 24. tjednu fetalnog razvoja, a snimka je izvršena pri uvećanju $\times 10$. Izvor: autorica.

1.5.1.4. Potkovičasti bubreg

Potkovičasti bubreg (lat. *ren arcuatus*) predstavlja najčešću fuzijsku anomaliju bubrega, s učestalošću od približno 1:500 živorođenih, uz predominaciju u muškaraca u omjeru 2:1 (113).

Embriološki, potkovičasti bubreg nastaje fuzijom metanefričkih blastema na donjim polovima prije završetka formiranja bubrežne čahure, tipično između 4. i 6. tjedna gestacije (113, 114). Kako spojeni bubrezi pokušavaju migrirati iz zdjelice prema normalnom lumbalnom položaju, njihova migracija biva zaustavljena donjom mezenteričnom arterijom, što rezultira karakterističnom niskom prednjom pozicijom i spojnicom u središnjoj liniji koja se naziva istmus (115). Istmus se nalazi između donjih polova u više od 90 % slučajeva, a u približno 80 % slučajeva sadrži funkcionalni bubrežni parenhim s vlastitom krvnom opskrbom, dok u preostalim slučajevima može biti građen od vezivnog tkiva (116). Novije studije sugeriraju da parenhimski istmus nastaje kao posljedica teratogenog događaja koji uključuje abnormalnu migraciju stražnjih nefrogenih stanica koje se potom spajaju tvoreći istmus, dok je teorija mehaničke fuzije prihvatljivija za slučajeve s fibroznim istmusom (114, 117).

Makroskopski, potkovičasti bubreg ima karakterističan izgled s dvama bubrežnim masama spojenim istmusom, najčešće smješten anteriorno od aorte u razini kralježaka L3-L4, iako se u 40 % slučajeva istmus nalazi neposredno inferiorno od donje mezenterične arterije (118). Zbog fuzije, bubrezi su malrotirani, donji su polovi spojeni, a sabirni sustavi usmjereni anteriorno. Ureteri silaze prema mokraćnom mjehuru anteriorno od istmusa, što može uzrokovati probleme s drenažom (Slika 6) (115).



Slika 6. Svjetlosnomikroskopska analiza potkovičastog bubrega u 34. tjednu fetalnog razvoja s očuvanom kortikomedularnom organizacijom, uz blagu dezorganizaciju tubularnih struktura. Preparat prikazan na fotografiji potječe iz arhiviranog uzorka humanog bubrega u 34. tjednu fetalnog razvoja, a snimka je izvršena pri uvećanju $\times 10$. Izvor: autorica.

Potkovičasti bubreg povezan je s povećanim rizikom od opstrukcije pijeloureteralnog spoja, vezikoureteralnog refluksa, nefrolitijaze i urinarnih infekcija zbog abnormalne anatomije i poremećene drenaže (119). Također postoji 3-4 puta veći rizik od bubrežnih maligniteta,

uključujući Wilmsov tumor, karcinom prijelaznog epitela i karcinoidne tumore, osobito u području istmusa (120, 121).

1.5.2. Genetika

Genetska podloga CAKUT-a izrazito je heterogena i još uvijek nedovoljno razjašnjena. Do danas je identificirano više od 50 gena povezanih s ne-sindromskim oblicima CAKUT-a, dok broj gena uključenih u sindromske entitete, u kojima se bubrežne anomalije javljaju kao dio multisistemskih poremećaja, prelazi 180 (122). Unatoč identifikaciji sve većeg broja gena povezanih s CAKUT-om, monogenske varijante objašnjavaju tek manji udio slučajeva, procijenjen na 5-20 % (123). Među najčešće zahvaćenim genima nalaze se *PAX2*, *HNF1B*, *EYA1*, *SIX1*, *SIX2* i *SALL1*, koji kodiraju transkripcijske faktore ključne za rane faze nefrogeneze, uključujući indukciju metanefričkog mezenhima i grananje ureteričkog pupoljka (91). Međutim, za značajan dio identificiranih varijanti još uvijek nedostaju jasni funkcionalni dokazi patogenosti, dok nepotpuna penetrantnost i varijabilna ekspresivnost dodatno otežavaju uspostavu pouzdanih genotip-fenotip korelacija (123-125).

Uz monogenske uzroke, sve je izraženija uloga varijanti broja kopija (engl. *copy number variation*, CNV) u patogenezi CAKUT-a. Posljednje studije pokazale su da se rijetki CNV-ovi mogu identificirati u približno 10-16 % bolesnika s CAKUT-om (126, 127). Rekurentne aberacije, poput delecija 17q12 (koje uključuju *HNF1B*), delecija 22q11.2 i duplikacija 16p11.2, često su povezane s multisistemskim zahvaćanjem, što odražava pleiotropne učinke zahvaćenih gena (128). Uvođenje sekvenciranja cijelog egzoma dodatno je unaprijedilo razumijevanje genetske arhitekture bolesti, omogućivši identifikaciju uzročnih i kandidatnih varijanti u značajnom udjelu bolesnika, uključujući i de novo mutacije koje, prema recentnim analizama, čine važan doprinos etiologiji CAKUT-a (129).

Važno je naglasiti da genetski čimbenici sami po sebi ne objašnjavaju cjelokupan fenotipski spektar bolesti. Epigenetski mehanizmi, uključujući promjene u metilaciji DNA i regulaciji nekodirajućih RNA, prepoznati su kao dodatna razina kontrole nefrogeneze koja može modulirati učinak genetskih varijanti (124). Istodobno, okolišni čimbenici, poput majčine izloženosti određenim lijekovima, metaboličkih poremećaja ili nutritivnih deficita, dodatno utječu na rizik razvoja CAKUT-a, vjerojatno kroz interakciju s genetskom predispozicijom (124).

U tom kontekstu, recentna studija Westlanda i suradnika temeljena na integraciji genetičkih i bioinformatičkih analiza identificirala je nove kandidatne gene za CAKUT, uključujući *DLG1*, *KIF12*, *EDA2R*, *PCDH9* i *TRAF7* (130). Iako njihova uloga još nije u potpunosti razjašnjena, ovi rezultati otvaraju nove smjerove istraživanja usmjerene na razumijevanje molekularnih mehanizama koji stoje u osnovi poremećene nefrogeneze.

1.5.2.1. Receptor za ektodisplazin A2

Receptor za ektodisplazin A2 (EDA2R), poznat i kao XEDAR (engl. *X-linked ectodysplasin-A2 receptor*), pripada obitelji receptora faktora nekroze tumora (TNFR) te je kodiran genom smještenim na kromosomu Xq12 (131-133). Strukturno, riječ je o transmembranskom proteinu tipa III koji u izvanstaničnoj domeni sadrži tri cisteinom bogata ponavljanja karakteristična za TNFR obitelj. Za razliku od većine srodnih receptora, EDA2R ne posjeduje klasičnu unutarstaničnu domenu smrti (133). Prirodni ligand ovog receptora jest EDA-A2, izoforma ektodisplazina A koja nastaje alternativnim prekrajanjem gena EDA i razlikuje se od izoforme EDA-A1 za samo dvije aminokiseline, no unatoč toj minimalnoj razlici izoforme pokazuju strogu receptorsku specifičnost (133).

Nakon vezanja liganda dolazi do regrutacije adaptorskih proteina iz obitelji TRAF, uključujući TRAF1, TRAF3 i TRAF6, pri čemu se TRAF6 smatra glavnim posrednikom signalizacije (134). Time se pokreću nizvodni signalni putevi, ponajprije NF- κ B i JNK, koji sudjeluju u regulaciji proliferacije, diferencijacije, preživljenja i apoptoze stanica (134, 135). Uz to, pokazano je da EDA2R može aktivirati i nekanonički NF- κ B put, obilježen procesuiranjem p100 u p52 i nuklearnom translokacijom p52/RelB kompleksa (136).

EDA2R je identificiran i kao transkripcijska meta tumor-supresorskog proteina p53, čime se dodatno povezuje s regulacijom stanične smrti i senescencije (137). U skladu s tim, aktivacija signalnog puta EDA2R/EDA-A2 povezana je s indukcijom apoptoze u različitim staničnim tipovima, uključujući stanice folikula dlake, epitelne stanice žlijezda slinovnica te različite tumorske stanice (138-141). Analize transkriptomskih podataka iz više tkiva pokazale su da ekspresija EDA2R raste s dobi u nizu organskih sustava, uključujući adipozno tkivo, krvne žile, srce i skeletne mišiće, što upućuje na njegovu moguću ulogu u regulaciji proinflamatornih procesa povezanih sa starenjem (137).

Tijekom embrionalnog razvoja EDA2R se pretežno eksprimira u derivatima ektoderma, osobito u diferencirajućim folikulima dlake, dok je njegova ekspresija u ranijim razvojnim stadijima minimalna (131, 133). Mutacije u genu EDA uzrokuju ektodermalnu displaziju, skup poremećaja obilježenih abnormalnim razvojem struktura ektodermalnog podrijetla, uključujući dlake, zube, nokte i znojne žlijezde (142, 143). U novije vrijeme pokazano je da je njegova ekspresija povišena u bubrezima dijabetičkih miševa i ljudi, gdje sudjeluje u induciranju apoptoze podocita te smanjenju ekspresije nefrina putem mehanizama ovisnih o reaktivnim kisikovim vrstama (engl. *reactive oxygen species*, ROS), što upućuje na njegov doprinos patogenezi dijabetičke nefropatije (144).

1.5.2.2. Protokadherin 9

Protokadherini predstavljaju najbrojniju podskupinu kadherinske nadporodice adhezijskih molekula ovisnih o kalciju, s izraženom ekspresijom u središnjem živčanom sustavu tijekom embrionalnog razvoja i u odrasloj dobi (145, 146). Gen *PCDH9* smješten je na kromosomu 13q21.32 i kodira protein ekspimiran u širokom rasponu tkiva, s osobito izraženom ulogom u staničnoj adheziji i sinaptičkom signaliziranju u moždanom tkivu (147, 148).

Istraživanja posljednjih godina ukazuju na potencijalnu tumor-supresorsku ulogu *PCDH9* u različitim malignim tumorima. Smanjena ekspresija ovog proteina zabilježena je u hepatocelularnom karcinomu, glioblastomu, melanomu i limfomu plaštenih stanica, pri čemu gubitak ekspresije korelira s lošijom prognozom, većom invazivnošću tumora i povećanom migracijom tumorskih stanica (149-152). Utišavanje gena *PCDH9* u hepatocelularnom karcinomu često je posredovano epigenetskim mehanizmima, osobito hipermetilacijom promotorske regije, a metilacija *PCDH9* povezana je s većom veličinom tumora i izraženijom intrahepatičnom diseminacijom (150).

Na molekularnoj razini, *PCDH9* regulira stanična adhezijska svojstva i modulira signalne puteve ključne za epitelno-mezenhimsku tranziciju (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT). Zhu i suradnici pokazali su da *PCDH9* inhibira EMT u hepatocelularnom karcinomu povećanjem aktivnosti glikogen sintaza kinaze-3 β (GSK-3 β) i posljedičnom inhibicijom transkripcijskog faktora Snail1 (153). Osim uloge u karcinogenezi, *PCDH9* povezan je i s neurološkim i psihijatrijskim poremećajima. Smanjena ekspresija ovog gena u moždanom tkivu i

perifernoj krvi opisana je u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem, što upućuje na njegovu potencijalnu ulogu u patofiziologiji afektivnih poremećaja (154).

1.5.2.3. Faktor 7 povezan s TNF receptorom

Faktor 7 povezan s TNF receptorom (engl. *TNF Receptor-Associated Factor 7*, *TRAF7*) smješten je na kromosomu 16p13.3 i kodira protein koji pripada obitelji TRAF (engl. *TNF Receptor-Associated Factor*) E3 ubikvitin ligaza. Za razliku od ostalih članova ove obitelji, TRAF7 umjesto karakteristične TRAF-C domene sadrži sedam WD40 ponavljajućih sekvencija na C-terminalnom kraju (155, 156). U bubrežnom tkivu ekspresija *TRAF7* relativno je povišena u tubularnim epitelnim stanicama u usporedbi s glomerulima ili intersticijskim odjeljcima (155).

TRAF7 sudjeluje u regulaciji prirođenog imuniteta, upalnih odgovora i apoptoze. Ima ključnu ulogu u NF- κ B signalnom putu na način da stupa u interakciju s MEKK3, važnim signalnim proteinom u TNF-induciranoj aktivaciji NF- κ B, te potiče ubikvitinaciju i razgradnju NEMO i p65, ključnih sastavnica ovog puta (156, 157). Time TRAF7 djeluje kao negativni regulator NF- κ B aktivnosti.

Somatske mutacije *TRAF7* identificirane su kao pokretači tumorigeneze u nekoliko tipova tumora, uključujući meningeome (osobito sekretornog podtipa), adenomatoidne tumore spolnog sustava, intraneuralne perineuriome te manji udio malignih mezotelioma pleure (158–161). Sve navedene mutacije grupiraju se unutar WD40 domena proteina i dovode do aberantne aktivacije NF- κ B signalizacije (160).

NF- κ B signalizacija funkcionalno je povezana s epitelno-mezenhimskom tranzicijom (EMT) putem regulacije transkripcijskih čimbenika poput Snaila, Sluga i Twista (162, 163). Aktivacija NF- κ B korelira s povišenom ekspresijom ovih EMT-inducirajućih čimbenika u različitim karcinomima, uključujući karcinom dojke (162, 163). Međutim, točni molekularni mehanizmi kojima NF- κ B orkestrira EMT ostaju nepotpuno razjašnjeni.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti prostorni i vremenski obrazac izražaja gena i proteina EDA2R, PCDH9 i TRAF7 u zdravim i CAKUT-om pogođenim humanim fetalnim uzorcima bubrega. Također, cilj je bio istražiti obrazac izražaja navedenih gena i proteina tijekom faza normalnog razvoja metanefrosa u kori i srži humanih fetalnih uzoraka.

Nadalje, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i pokušati odrediti kako funkcionalno utišavanje *Dabl* gena *yotari* miševa utječe na izražaj EDA2R, PCDH9 i TRAF7 proteina u embrionalnim i postnatalnim uzorcima miša.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi i kvantificirati vremenski i prostorni izražaj EDA2R, PCDH9 i TRAF7 proteina u razvojnim stadijima zdravog humanog fetalnog bubrega (CTRL) i bubrezima zahvaćenim CAKUT-om (hipoplazija, displazija, udvostručeni ureter i potkovičasti bubreg) od 6. do 41. gestacijskog tjedna, primjenom indirektna imunofluorescencije.
2. Utvrditi i kvantificirati vremenski i prostorni izražaj EDA2R, PCDH9 i TRAF7 proteina u strukturama bubrega *Dabl*^{-/-} (*yotari*) i kontrolnih miševa gestacijskih dana 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) te 4. i 14. postnatalnog dana (P4, P14) primjenom indirektna imunofluorescencije.
3. Ispitati postojanje razlika u prostornom i vremenskom izražaju EDA2R, PCDH9 i TRAF7 između čovjeka i miša u odgovarajućim razvojnim stadijima primjenom imunofluorescencijske analize.
4. Ispitati i kvantificirati transkripciju mRNA *EDA2R*, *PCDH9* i *TRAF7* gena metodom qRT-PCR u tkivima bubrega zdravog humanog fetalnog bubrega (CTRL) i bubrezima zahvaćenim CAKUT-om (hipoplazija, displazija, udvostručeni ureter i potkovičasti bubreg).

2.2. Hipoteze istraživanja

1. Proteini EDA2R, PCDH9 i TRAF7 eksprimirani su tijekom nefrogeneze kod čovjeka i miša što ukazuje na njihovu ulogu u razvoju bubrega.

2. Izražaj EDA2R, PCDH9 i TRAF7 tijekom fetalnog razvoja bubrega pokazuje različit obrazac prostorne i vremenske ekspresije u zdravih fetalnih uzoraka čovjeka i miša u odnosu na CAKUT uzorke.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom poglavlju ukratko su predstavljani svi materijali korišteni u istraživanju te protokoli za hematoksilin-eozin i imunofluorescentno bojanje, kao i kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR). Dodatno su opisani postupci prikupljanja, obrade i analize uzoraka bubrega ljudskog i mišjeg podrijetla.

3.1. Etičko odobrenje

Etičko odobrenje izdalo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split (klasa: 003-08/16-03/0001, broj odobrenja: 2181-198-03-04-16-0024) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (klasa: 003-08/23-03/0015, broj protokola: 2181-198-03-04-23-0073, datum odobrenja: 27. rujna 2023.). Istraživanje je provedeno u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije, a tijekom njezina provođenja poštovane su etičke i bioetičke smjernice, uključujući očuvanje osobnog integriteta, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost.

3.2. Prikupljanje humanih uzoraka

Ukupno 38 parafinskih blokova s embrionalnim i fetalnim bubrežnim tkivom u rasponu gestacijske dobi od 6. do 41. tjedna, prikupljeno je u Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split (Tablica 1). Uzorci su prikupljeni nakon spontanijih pobačaja i eugeničkih prekida trudnoće uzrokovanim teškim fetalnim malformacijama. Prikupljanje i obrada uzoraka odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, a postupci su provedeni u skladu s načelima Helsinške deklaracije (164). U analizu su uključeni samo uzorci bez znakova postmortalne maceracije. Gestacijska dob odredila se na temelju anamnestičkih podataka o posljednjoj menstruaciji i biometrijskih mjerenja, uključujući duljinu tjeme-trtica (engl. *crown-rump length*) (165). Klasifikacija bubrežne patologije temeljila se na standardnim histopatološkim kriterijima i makroskopskoj morfološkoj evaluaciji.

Bubrežno tkivo fiksirano je u 4% paraformaldehidu u 0,1 M fosfatnom puferu i uklopljeno je u parafinske blokove. Tkivo je rezano mikrotomom, a svaki deseti rez obojao se hematoksilin-eozinom (H&E) kako bi se utvrdila tkivna očuvanost. Svjetlosna mikroskopija koristila se za ispitivanje normalnih stadija fetalnog razvoja bubrega i patoloških nalaza u bubrezima zahvaćenim CAKUT-om.

Tablica 1. Uzorci ljudskih embrionalnih i fetalnih bubrega (n=38) analizirani u studiji

Grupe	Razvojna faza	Bubrežna i pridružena patologija	Gestracijska dob	Broj bubrežnih uzoraka
Zdravi bubrezi (CTRL)	Ph1	N/A	6	1
		N/A	10	1
		N/A	12	1
	Ph2	N/A	15	1
		N/A	16	1
		N/A	17	1
		N/A	18	2
		N/A	21	1
		N/A	23	1
	Ph3	N/A	24	1
		N/A	28	3
		N/A	29	1
		N/A	32	1
	Ph4	N/A	35	1
		N/A	37	1
		N/A	38	2
Potkovičasti bubrezi (HK)		Ren concreatus arcuatus, cystae multiplices corticales		22
	Ren concreatus arcuatus, tetras Fallot		26	1
	Syndroma Edwards, Ren arcuatus		30-31	1
	Syndroma Edwards, Ren arcuatus		34	1
Displastični bubrezi (DYS)	Megaureter lateris dextri, Dysplasia renis		21	2
	Renis dysplastica cysticus lateralis sinistri, agenesis renis dextri			
	Dysplasia multicystica renis dextri		27	1
	Cystes parvae focales			

	<i>Renes dysplastici cystici,</i>		
	<i>Syndroma Potter</i>		
	<i>Dysplasia renis multicystica</i>	35	2
	<i>bilateralis</i>		
	<i>Agensis renis dextri et dysplasia</i>		
	<i>renis sinistri cum ureter duplex</i>	37	1
	<i>Dysplasia hypoplastica, renis</i>		
	<i>bilateralis, syndroma Down,</i>	38	1
	<i>syndroma Potter</i>		
	<i>Syndroma Potter, Dysplasia renis</i>	39	1
Hipoplastični bubrezi (HYP)	<i>Hypoplasia renis lateris dextri</i>	30	1
	<i>Hypoplasia renis lateris sinistri</i>	37	1
	<i>Hypoplasia renis</i>	38	1
Bubrezi s udvostručenim ureterom (DK)	<i>Ureter duplex lateris dextri</i>	24	1
	<i>Ureter duplex lateris sinistri</i>	30	1
	<i>Pyelon et ureter duplex bilateralis</i>	41	1

3.2.1. Izračun veličine uzorka

Veličina uzorka određena je pomoću Meadove jednadžbe resursa (166), koja se često koristi za procjenu veličine uzoraka u laboratorijskim pokusima:

$$E=(N-1)-(T+B+I)$$

$$N = E + T + B + I + 1$$

Parametri za ovu analizu su određeni kako slijedi:

$$N = 18 + 4 + 3 + 12 + 1$$

$$N = 38$$

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

B je blokirajuća komponenta (manje 1): 4 razvojne faze (Ph1, Ph2, Ph3 i Ph4) - 1 = 3

T je komponenta liječenja, koja odgovara broju tretiranih skupina (uključujući kontrolnu

skupinu) koje se koriste ili broju postavljenih pitanja (manje 1): 5 (DU, HYP, DYS, HK i CTRL) - 1 = 4

E je stupanj slobode komponente pogreške i trebao bi biti negdje između 10 i 20 - (18)

I = broj stupnjeva slobode interakcije = 3 x 4 = 12

Prema navedenoj jednadžbi, korišteno je 38 uzoraka. Svaka ispitivana skupina sadržavala je minimalan broj od 3 uzorka iz čega slijedi da je uzorak dovoljan. Konačan broj uzoraka po dijagnostičkoj skupini bio je: bubrezi s udvostručenim ureterom (DU) n = 3, displastični bubreg (DYS) n = 8, hipoplastični bubreg (HYP) n = 3 te HK n = 4. Ova raspodjela odražava dostupnost tkiva, ispunjavanje kriterija uključenja i kvalitetu uzoraka.

3.3. Animalni uzorci

U ovom istraživanju koristili su se *yotari* (*Dab1*^{-/-}) miševi, koji nose mutaciju u genu *Dab1* rezultirajući funkcionalno neaktivnim proteinom. Miševi soja C57BL/6N uzgajani su u skupinama u standardnim polikarbonatnim kavezima (3 do 4 jedinke, uključujući najmanje jednog pripadnika svakog genotipa), uz neograničen pristup hrani i vodi, u temperaturno kontroliranom okruženju (23 ± 2 °C). Svjetlosni ciklus bio je postavljen na 12 sati umjetnog svjetla i 12 sati tame.

Gravidne ženke eutanazirane su 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) dana gestacije, nakon čega su se izolirali embriji. Dodatne skupine životinja eutanazirane su 4. i 14. postnatalnog dana (P4, P14). Za svaku analiziranu skupinu koristile su se tri do četiri jedinke.

Životinje su prethodno duboko anestetizirane pentobarbitalom, nakon čega je provedena transkardijalna perfuzija fosfatnim puferom (PBS, pH 7,2), a zatim s 4 % paraformaldehidom (PFA) u 0,1 M PBS-u. Bubrezi su eksplantirani i pojedinačno fiksirani u 4 % PFA-u u 0,1 M PBS-u tijekom noći, radi provedbe standardnih histoloških analiza, uključujući bojanje hematoksilin-eozinom i imunofluorescentno označavanje.

3.3.1. Izračun veličine uzorka

Veličina uzorka je određena pomoću gore navedene Meadove jednadžbe resursa (166):

$$E=N-B-T$$

$$E+B+T=N$$

$$20+3+1=24 \Rightarrow 12 \text{ wt} + 12 \text{ yot}$$

Gdje je:

N ukupan broj jedinki u studiji (minus 1)

B blokirajuća komponenta koja predstavlja utjecaje na okoliš dopuštene u dizajnu (minus 1): 4 razvojnih stadija (E13.5, E15.5, P4, P14) - 1 = 3

T 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 stupanj slobode komponente pogreške, koji bi trebao biti između 10 i 20 - (20)

Prema navedenoj jednadžbi, koristit ćemo 3 životinje po pojedinom razvojnom stadiju za divlji tip i *yotari* miša. Svaka ispitivana skupina sadržavat će 3 do 7 životinja svakog genotipa, što znači da će uzorak biti dostatan.

3.4. Histološka analiza

3.4.1. Priprema tkiva bubrega za histološku analizu

Tkivo je fiksirano u 4% otopini paraformaldehida (PFA) u 0.1 M fiziološkom otopinom puferiranom fosfatom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) preko noći, isprano radnim PBS-om i dehidriralo u uzlaznoj seriji otopina etanola (25%, 50%, 75%, 96%, 100%) i ksilena te uklopljeno u parafinske blokove. Mikrotomom su rezani 5 µm debeli rezovi i lijepljeni na predmetna stakalca. Prije histoloških analiza uzorci su deparafinizirani u ksilenima, rehidrirani u seriji silaznih otopina etanola (100%, 96%, 70%) i isprani u vodi.

3.4.2. Hematoksilin-eozin bojanje

Hematoksilin-eozin (HE) bojanje predstavlja temeljnu histološku metodu jer je tehnički jednostavno za izvođenje te omogućuje jasan prikaz brojnih tkivnih struktura. Hematoksilin boja jezgru u plavu boju i dobro prikazuje jezgrine detalje te druge kisele sastojke. Eozin različitim intenzitetom crvene boje boja citoplazmu, eritrocite, mišićno i vezivno tkivo.

Nakon deparafiniranja i rehidriranja uzorci su inkubirani u otopini Meyerova hematoksilina u trajanju od 10 minuta te su ispirani u običnoj mlakoj vodi. Potom su prebačeni u otopinu eozina na 5 minuta, dehidrirani u seriji rastućih etanola, prosvjetljeni ksilenom, uklopljeni

u Canada balzam, prekriveni pokrovnim stakalcem te proučavani svjetlosnim mikroskopom kako bi se mogla potvrditi prethodno postavljena dijagnoza i procijeniti očuvanost tkiva prije imunofluorescencijskog bojanja (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

3.4.3. Imunofluorescencijsko bojanje

Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije u etanolu i destiliranoj vodi, uzorci su kuhani 30 minuta u citratnom puferu (pH 6,2) u kuhalu na paru u svrhu otkrivanja antigena. Uzorci su potom hlađeni na sobnu temperaturu, ispirani s radnom otopinom 0,01 M PBS-a, odvajani peroksidaza antiperoksidaza olovkom (PAP) te 20 minuta inkubirani puferom za blokiranje proteina (Protein Block, ab64226, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo (UK)). Nadalje, uzorci su inkubirani u vlažnoj komori preko noći s primarnim protutijelima (Tablica 2). Nakon ispiranja PBS-om nanijeta su sekundarna protutijela te su inkubirana u vlažnoj komori, u mraku, jedan sat (Tablica 2). Nakon ispiranja PBS-om, dodao se 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI), bojilo za jezgre jednu minutu te su uzorci uklopljeni u Immu-mount medij i prekriveni pokrovnim stakalcem.

Tablica 2. Primarna i sekundarna protutijela korištena u indirektoj imunofluorescenciji

Protutijelo		Kataloški broj	Domaćin	Razrijeđenje	Proizvođač
Primarna protutijela	Anti-EDA2R/XEDAR antibody	ab203667	Kunić	1:120	Abcam (Cambridge, UK)
	PCDH9 Polyclonal antibody	25090-1-AP	Kunić	1:200	Proteintech Group, Inc (Rosemont, IL, USA)
	TRAF7 Polyclonal antibody	11780-1-AP	Kunić	1:50	Proteintech Group, Inc (Rosemont, IL, USA)
	Aquaporin 1/AQP1 Antibody (B-11)	sc-25287	Miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

Lecitini	Aquaporin 2/AQP2 Antibody (E-2)	sc-515770	Miš	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
	Fluorescein labeled Lotus Tetragonolobus lectin (Ltl)	FL-1321	N/A	1:400	Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK
	Fluorescein labeled Dolichos biflorus agglutinin (Db)	FL-1031	N/A	1:400	Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK
Sekundarna protutijela	Rhodamine Red™- X (RRX) AffiniPure™ Donkey Anti- Mouse IgG (H+L)	715-295-151	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, USA)
	Alexa Fluor® 488 AffiniPure™ Donkey Anti- Mouse IgG (H + L)	715-545-150	Magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, USA)

3.5. Prikupljanje podataka - Obrada mikrofotografija i kvantifikacija

Snimanje humanih fetalnih uzoraka bubrega u razvoju i fetalnih bubrega pogođenih CAKUT-om kao i uzoraka bubrega *Dab1^{-/-}* (*yotari*) i kontrolnih miševa razvojnih stadija E13.5, E15.5, P4 i P14 provedeno je koristeći epifluorescentni mikroskop (Olympus BX51, Tokio, Japan) i uzorci su fotografirani pomoću Nikon DS-Ri2 kamere (Nikon Corporation, Tokio, Japan) sa softverom NIS-Elements F.

EDA2R, PCDH9 i TRAF7 su ispitivani u najmanje 10 nepreklapajućih, reprezentativnih područja u fetalnom korteksu bubrega. Sve slike snimljene su s povećanjem od 40x uz dosljedno trajanje ekspozicije. Pozitivno bojenje za EDA2R, PCDH9 i TRAF7 definirano je kao difuzno ili točkasto zeleno bojenje.

Analiza slika provedena je korištenjem softvera ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). U početku je curenje fluorescencije minimizirano oduzimanjem crvenog kontra-signala od zelene fluorescencije. Slike su duplicirane, a medijan filter s radijusom od 7,0 piksela primijenjen je na jednu od slika. Pozitivan signal izoliran je oduzimanjem filtriranih slika od nefiltriranih slika. Potom su rezultirajuće slike pretvorene u 8-bitne slike i svaka slika je prilagođena koristeći metodu praga (konkretno, algoritam za prag trokutaste metode). Postotak fluorescencije tada je određen koristeći opciju "*analyze particles*".

3.6. Izolacija RNA i qRT-PCR

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR) jedna je od najpouzdanijih metoda za mjerenje razine ekspresije mRNA zahvaljujući visokoj osjetljivosti i specifičnosti. Načelo metode počiva na uporabi fluorescentnih molekula koje omogućuju da se amplifikacija i detekcija PCR produkta odvijaju istodobno, unutar iste reakcije. Kako se količina umnoženog DNA produkta povećava iz ciklusa u ciklus, tako proporcionalno raste i intenzitet fluorescentnog signala (167, 168). Primjenom sonde obilježenih različitim fluorescentnim reporterima moguće je u jednoj reakciji paralelno pratiti ekspresiju više ciljnih gena, što čini osnovu multipleks pristupa.

Središnji analitički parametar metode jest ciklus praga (Ct), tj. broj ciklusa potreban da fluorescentni signal nadmaši unaprijed zadanu razinu pozadinske fluorescencije. Iz dobivenih Ct vrijednosti konstruira se standardna krivulja koja odražava odnos fluorescencije i broja provedenih ciklusa. Što je početna količina ciljane nukleinske kiseline veća, prag detekcije dosegnut je u ranijem ciklusu, a Ct vrijednost je posljedično niža. Upravo ta zakonitost omogućuje precizno određivanje količine ciljnih molekula u širokom rasponu koncentracija, uz zadržavanje osjetljivosti i specifičnosti svojstvenih PCR-u.

Pouzdanost analize ekspresije gena uvelike ovisi o pravilnom odabiru početnica, dok je za smanjenje varijabilnosti nužna odgovarajuća normalizacija podataka. U tu svrhu primjenjuju se različiti pristupi, uključujući normalizaciju prema količini uzorka, volumenu tkiva te korištenje stabilno eksprimiranih referentnih (endogenih) gena. Takvi geni, često označeni kao „housekeeping“ geni, karakterizirani su stabilnom ekspresijom neovisno o eksperimentalnim uvjetima te sudjeluju u osnovnim staničnim funkcijama (169-172).

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su uzorci humanih fetalnih bubrega (n = 20), raspoređeni u pet skupina: kontrolna skupina (CTRL, n = 4), udvostručeni ureter (DU, n = 3), hipoplazija (HYP, n = 3), potkovičasti bubreg (HK, n = 4) te displazija (DYS, n = 6). Tkivo je prethodno fiksirano u paraformaldehidu i uklopljeno u parafin (FFPE). RNA je izolirana pomoću komercijalnog PureLink™ FFPE kita (kat. br. K156002, Invitrogen, Waltham, MA, SAD), pridržavajući se uputa proizvođača. Zaostala genomski DNA uklonjena je tretmanom DNazom I (Amplification Grade, kat. br. 18068015 Invitrogen, Waltham, MA, SAD), nakon čega je iz 2 µg ukupne RNA provedena reverzna transkripcija uporabom High-Capacity cDNA Reverse Transcription kita (kat. br. 4368814, Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD).

Reakcijska smjesa pripremljena je u pločama s 96 jažica te je sadržavala vodu bez nukleaza, genski specifične početnice, SYBR® Green Supermix (Kat. br. 1725121, BioRad, Hercules, CA, SAD) i sintetiziranu cDNA. Početnice su odabrane na temelju prethodno objavljenih podataka (Tablica 3) (173-175), a GAPDH i PPIA poslužili su kao referentni geni za normalizaciju. Svaka serija uključivala je negativne kontrole (NTC), pripremljene s istim komponentama reakcijske smjese, ali bez cDNA matrice. Amplifikacija i očitavanje fluorescencije provedeni su na instrumentu BioRad CFX96 (C1000 Touch Thermal Cycler), a relativna ekspresija ciljnih gena izračunata je komparativnom Ct metodom uz prethodnu normalizaciju prema NTC vrijednostima.

Tablica 3. Početnice korištene u RT-qPCR metodi

Gen	Lijeva početnica (5'–3')	Desna početnica (5'–3')
<i>EDA2R</i>	TTA CCA TGG CCT CCT GCA C	GGG CTG GGA ACT TCA AAG G
<i>PCDH9</i>	TCC CAA CTC TGA TGG GCC TTT GGG	GGC TCT GGT CAG GGT GTG CC
<i>TRAF7</i> (1)	AGG CTC CTA CGA CCC TCA G	AGC CGC TGT AGA GTT TGC AC
<i>TRAF7</i> (2)	AAG AGT GCC CGC TAC AAC C	CCC GTC AGC TTT TGT GAT GG

<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>PPIA</i>	GGCCAGGCTCGTGCCGTTTT	TGCTGTCTTTGGGACCTTGTCTGC

3.7. Statistički postupci

Svi izračuni uzoraka humanih fetalnih bubrega i bubrega zahvaćenih CAKUT-om provedeni su u programu Excel v2403 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD). Statističke analize učinjene su pomoću softverskog paketa GraphPad Prism v8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD), pri čemu se razina statističke značajnosti postavila na $p < 0,05$.

Normalnost distribucije podataka ispitana je Shapiro-Wilkovim testom. Za usporedbu grupa u analizi imunoekspresije korištena je jednosmjerna analiza varijance (One-way ANOVA), uz Tukeyjev post hoc test za višestruke usporedbe.

Za analizu dinamike i trendova izražavanja proteina tijekom četiri razvojne faze zdravih kontrolnih bubrega primijenjena je metoda linearne i nelinearne regresije. Analiza je uključivala izračunavanje prosječnih vrijednosti postotka obojenosti kore bubrega u uzorcima koji predstavljaju različite razvojne faze. Regresijski koeficijenti (procjene $\pm$ standardna pogreška) korišteni su za kvantifikaciju trendova, dok se koeficijent determinacije (R^2) koristio za procjenu kvalitete modela. Nagib (β) regresijske linije korišten je za opisivanje smjera i intenziteta linearnih trendova. Varijabilnost unutar skupina prikazana je standardnom devijacijom (SD).

Grafički prikazi izrađeni su u programu GraphPad Prism v8.4.3, dok su se slikovni prikazi finalno oblikovali u Adobe Photoshopu v9.0 (CS2).

Statistička analiza *yotari* i kontrolnih miševa E13.5, E15.5 te P4 i P14 provedena je pomoću softvera GraphPad Prism (verzija 9.0.0, GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Dvosmjerna analiza varijance (ANOVA), uz Tukeyjev post hoc test za višestruke usporedbe, korištena je za procjenu razlika u postotku površine stanica pozitivnih na Eda2r, Pcdh9 i Traf7 kroz različite razvojne stadije (E13.5, E15.5, P4 i P14). Dodatno su ispitane razlike u imunološkoj ekspresiji između bubrežne kore i srži na postnatalne dane 4 i 14 među promatranim fenotipovima. Podaci

su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD), pri čemu je statistička značajnost određena na razini $p < 0,05$.

Grafovi su izrađeni u programu GraphPad Prism (verzija 9.0.0), dok su slikovni prikazi sastavljeni u programu Adobe Photoshop (verzija 21.0.2). Mikrofotografije su podvrgnute uklanjanju pozadine i pojačavanju kontrasta radi bolje vidljivosti i jasnoće.

4. REZULTATI

4.1. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja EDA2R, PCDH9 i TRAF7 proteina u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta

U prvom dijelu prikazani su rezultati imunofluorescencijskog bojenja proteina EDA2R, PCDH9 i TRAF7 u zdravim i CAKUT-om zahvaćenim humanim fetalnim uzorcima bubrega. Na hematoksilin-eozin preparatima uočene su jasne morfološke razlike između zdravih i patoloških bubrega. Ekspresija navedenih proteina procijenjena je imunofluorescencijom u tubulima, sabirnim kanalićima i glomerulima tijekom razvoja. Njihova imunoreaktivnost kvantitativno je određena mjerenjem postotka površine pozitivnog signala u području kore fetalnog bubrega (uključujući nefrogenu zonu i jukstamedularnu regiju) te bubrežne srži tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4. Provedena je statistička usporedba raspodjele površine pozitivnog signala u području kore i srži u embrionalnim i fetalnim bubrezima, pri čemu su zdravi uzorci uspoređeni s CAKUT podtipovima: bubrezima s udvostručenim ureterom (DK), potkovičastim (HK), hipoplastičnim (HYP) i displastičnim (DYS) bubrezima. Rezultati su izraženi kao postotak površine pozitivnog signala, a dinamika ekspresije kroz četiri razvojne faze analizirana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem.

4.1.1. H&E bojenje normalnih ljudskih fetalnih bubrega i bubrega zahvaćenih prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta

Histološkom analizom zdravog humanog fetalnog bubrega uočena je dobro razvijena nefrogena zona, kao i podociti kubičnog oblika (Slika 7a).

Bubreg s udvostručenim ureterima pokazivao je dva pelvikalicealna sustava (Slika 7b). Iako mikroskopske snimke ne prikazuju taj specifični presjek, bubrežni parenhim bio je uredne građe.

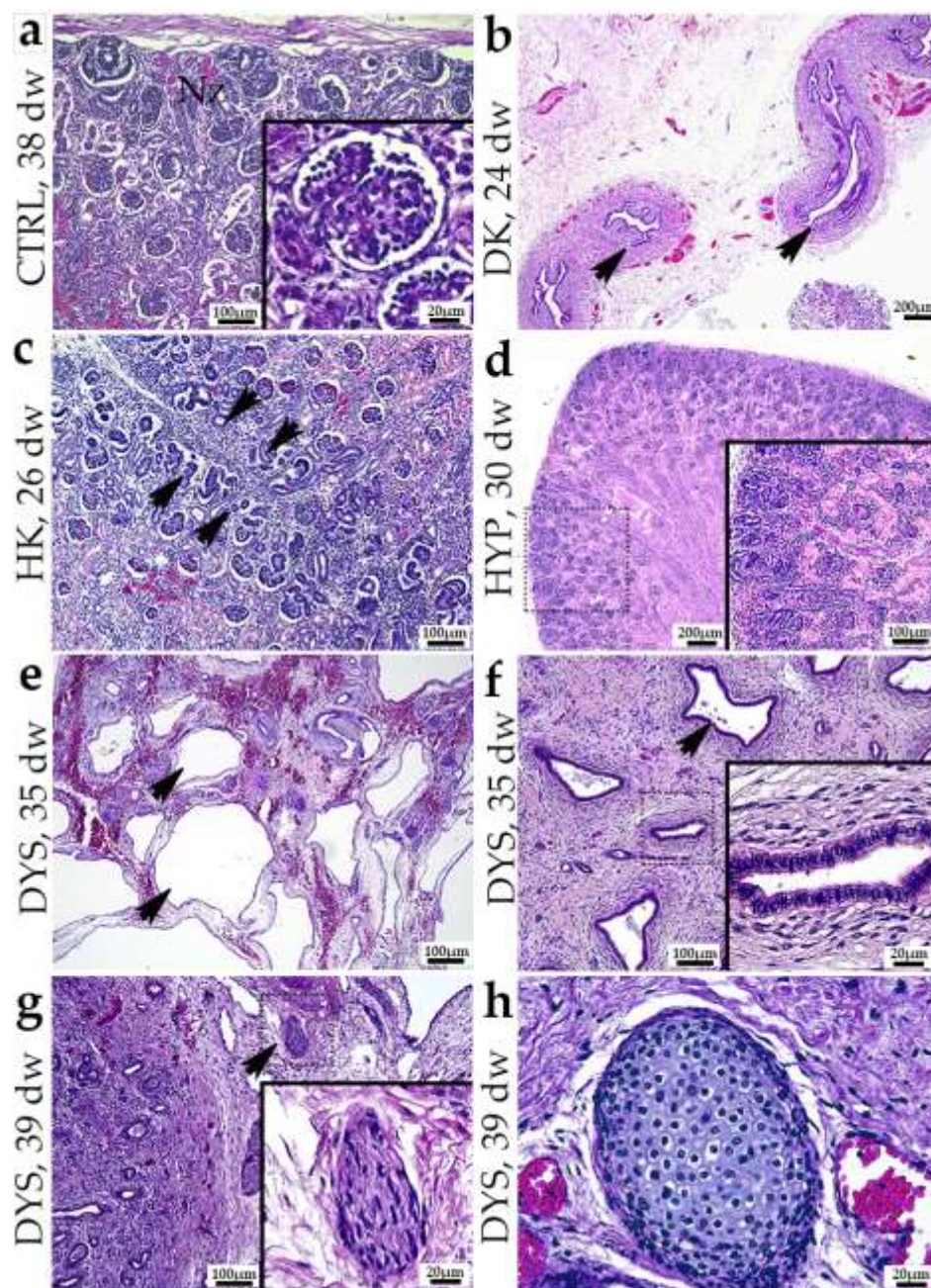
Potkovičasti bubreg imao je dvije nefrogene zone sastavljene od primitivne bazofilne trake u kojoj se odvija formiranje glomerula i tubula (Slika 7c).

Hipoplastični bubreg pokazao je normalnu strukturu, ali s užom nefrogenom zonom u usporedbi s normalnim bubregom. Također ga je karakterizirao smanjen broj nefrona (Slika 7d).

Displastični bubrezi pokazali su poremećenu diferencijaciju nefrona i bubrežnih tubula, s atipično formiranim metanefričkim komponentama i nepravilnom strukturnom organizacijom. U

bubrezima s displazijom prisutne su ciste koje potječu iz primitivnih kanala (Slika 7e). Kanalići su pokazivali različite oblike, od okruglih do ovalnih, a neki su bili zakrivljeni. Njihova stijenka bila je uglavnom obložena visokim cilindričnim epitelom, okruženim fibromuskularnim omotačem, a također je uočena i lobularna dezorganizacija (Slika 7f).

Rudimentarni kanalići pojavljivali su se pojedinačno ili u malim nakupinama unutar jasno ograničenih lobula sastavljenih od izduženih stanica vezivnog tkiva. U mezenhimu displastičnih bubrega pronađena su i nemijelinizirana živčana vlakna (Slika 7g). Nadalje, uočena su jasno ograničena područja pravilno razvijene hrskavice (Slika 7h).



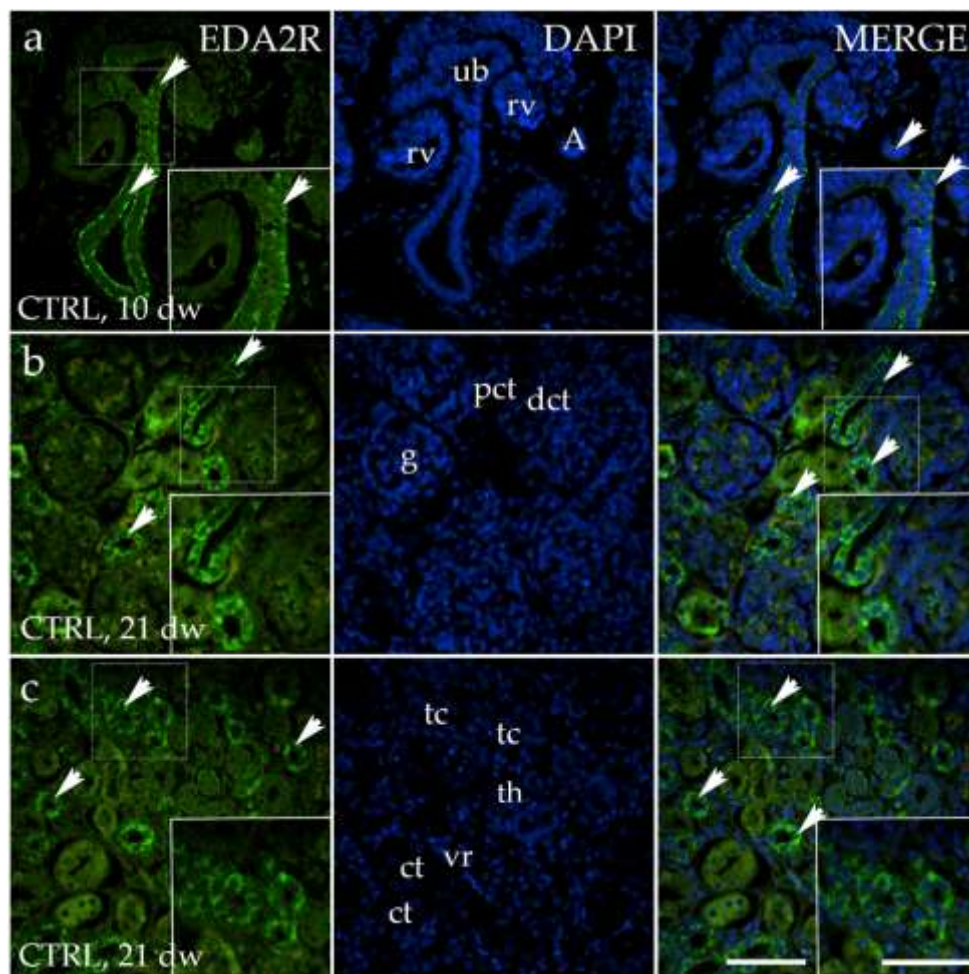
Slika 7. Histologija normalnog fetalnog bubrega u 38. razvojnog tjednu (a) te bubrega zahvaćenih prirođenim anomalijama: bubreg s udvostručenim ureterima (DK) u 24. razvojnog tjednu (dw) (b), potkovičasti bubreg (HK) u 26. tjednu (c), hipoplastični bubreg (HYP) u 30. tjednu (d) i displastični bubreg (DYS) u 35. tjednu (e, f) i 39. tjednu (g, h) (H&E). Najizraženije značajke uočene za svaki promatrani fenotip prikazane su u umetcima koji odgovaraju isprekidanim okvirima. Slike su snimljene pri povećanjima $\times 4$ (b, d), $\times 10$ (a, c, d umetak, e, f, g) i $\times 40$ (h,

umetci a, f, g). Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

4.1.2. Izražaj EDA2R u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta

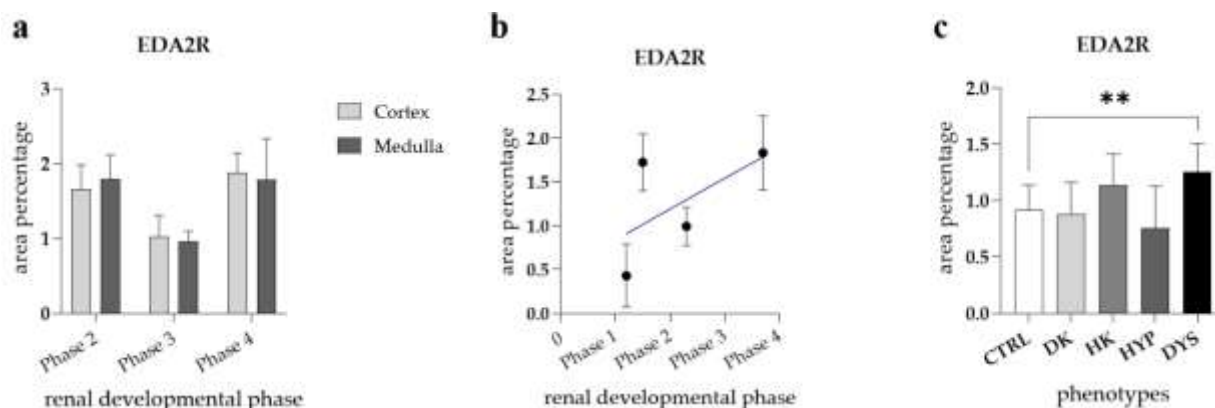
EDA2R je pokazao izraženu točkastu imunorektivnost lokaliziranu u apikalnim i bazalnim membranama stanica mokraćovodnog pupoljka bubrega u razvoju tijekom razvojne faze 1 (Ph1) (Slika 8a). Kanalići u obliku slova S i u obliku zareza, kao i bubrežni mjehurići nisu pokazivali specifično bojenje (Slika 8a). U kasnijim razvojnim fazama uočena je difuzna citoplazmatska imunoreaktivnost u jukstaglomerularnoj regiji zdravog bubrega. Najizraženija ekspresija EDA2R zabilježena je u distalnim zavijenim tubulima, dok je nešto slabiji signal prisutan u proksimalnim zavijenim tubulima i glomerulima (Slika 8b). Izraženo bojenje također je uočeno u debelom segmentu Henleove petlje u području bubrežne srži. U sabirnim kanalčićima nije zabilježena imunoreaktivnost (Slika 8c).

Prilikom usporedbe postotka površine stanica pozitivnih na EDA2R između kore i srži zdravih fetalnih bubrega kroz promatrane razvojne faze nije uočena značajna razlika (Slika 8d). Analizom linearnog trenda među promatranim razvojnim fazama također nije utvrđena značajna razlika ($R^2 = 26,62\%$, $\beta = 0,007 \pm 1,791$, Slika 8e).



Slika 8. Imunofluorescencijsko bojanje kore (a, b) i srži (c) zdravog humanog fetalnog bubrega u 10. i 21. razvojnom tjednu (dw) (CTRL) s protutijelima za receptor za ektodisplazin A2 (EDA2R). Strelice označavaju obrazac ekspresije EDA2R u mokraćovodnom pupoljku (ub), ampuli (A), bubrežnom mjehuriću (rv), glomerulima (g), proksimalnim zavijenim kanalićima (pct) i distalnim zavijenim kanalićima (dct) kore bubrega, te u vasa recta (vr), sabirnim tubulima (ct) i debelim (tc) i tankim (th) segmentima Henleove petlje u bubrežnoj srži, prikazanim na slici s nuklearnim bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Imunoekspresija preklopljenih mikrofotografija EDA2R i DAPI u zdravom humanom fetalnom bubregu (MERGE). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Mjerilo je 50 μm , što se odnosi na sve slike. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

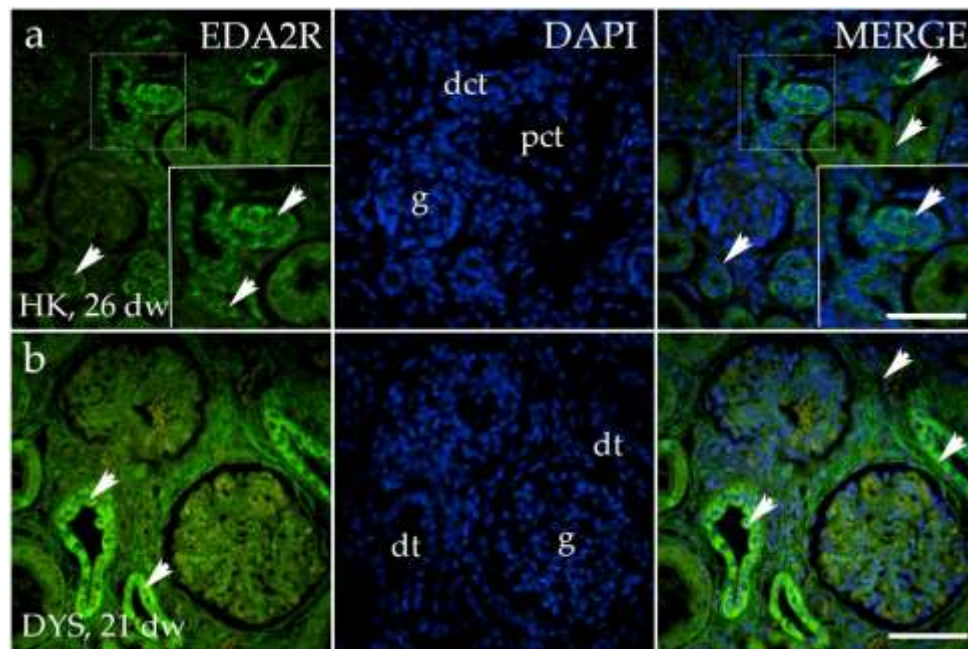
Nije uočena statistički značajna razlika pri usporedbi postotka površine stanica pozitivnih na EDA2R između kore i srži zdravih humanih fetalnih bubrega kroz ispitivane razvojne faze (Slika 9a). Također, formalnom analizom linearnog trenda među promatranim razvojnim fazama nije utvrđena značajna razlika ($R^2 = 26,62 \%$, $\beta = 0,03501 \pm 0,01319$; Slika 9b).



Slika 9. Postotci površine pozitivnog signala receptora za ektodisplazin A2 (EDA2R) u kori i srži zdravog humanog fetalnog bubrežnog tkiva tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4 (**a**). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) te analizirani jednosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test za višestruke usporedbe. U svakoj razvojnoj fazi analizirano je deset reprezentativnih slika po promatranom području. Dinamika ekspresije EDA2R (**b**) prikazana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem postotaka pozitivne površine kroz razvojne faze u kori i srži kontrolnih (CTRL) fetalnih bubrega. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Postotci pozitivne površine EDA2R u fetalnom tkivu bubrega s udvostručenim ureterima (DK), potkovičastih bubrega (HK), hipoplastičnih bubrega (HYP) i displastičnih bubrega (DYS) prikazani su u **c**. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) te analizirani jednosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Statistički značajne razlike označene su s ** $p < 0,01$. U svakoj vremenskoj točki analizirano je dvadeset reprezentativnih slika. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Obrasci bojenja EDA2R u potkovičastim (HK), bubrezima s udvostručenim ureterima (DK) i hipoplastičnim (HYP) bubrezima uglavnom odgovaraju njihovoj lokalizaciji i intenzitetu (Slika 10a). U displastičnom bubregu EDA2R je snažno izražen u displastičnim tubulima, dok je njegova ekspresija slabija u glomerulima i okolnom vezivnom tkivu (Slika 10b). Usporedba postotka površine stanica pozitivnih na EDA2R između kontrolnih bubrega i bubrega zahvaćenih

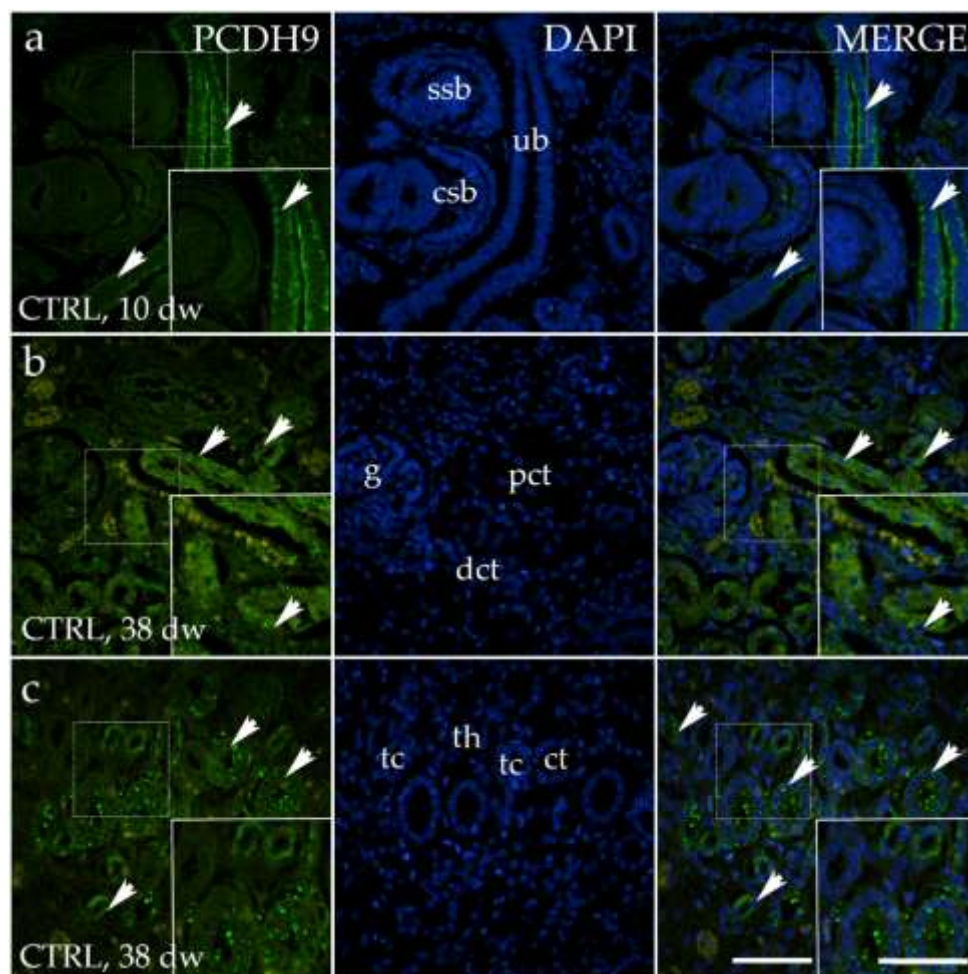
CAKUT-om pokazala je značajno manji udio EDA2R-pozitivnih stanica u kontrolnim bubrezima u odnosu na displastične (DYS) bubrege ($p < 0,01$; Slika 10c).



Slika 10. Imunofluorescencijsko bojenje humanih fetalnih bubrega protutijelima na receptor za ektodisplazin A2 (EDA2R) (**a**, **b**). Strelice označavaju obrazac ekspresije EDA2R u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim kanalićima (pct), distalnim zavijenim kanalićima (dct) i displastičnim tubulima (dt), prikazanim na slici s nuklearnim bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Obrasci bojenja EDA2R u potkovičastim bubrezima (HK), bubrezima s udvostručenim ureterima (DK) i hipoplastičnim bubrezima (HYP) uglavnom se podudaraju s obzirom na lokalizaciju i intenzitet, stoga je kao reprezentativna odabrana slika uzorka potkovičastog bubrega u 26. razvojnog tjednu. Prikazana je imunoekspresija preklopljenih EDA2R i DAPI mikrofotografija (MERGE) u potkovičastom bubregu (HK) u 26. tjednu (**a**) i displastičnom bubregu (DYS) u 21. tjednu (**b**). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Mjerilo je 50 μm , što se odnosi na sve slike. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

4.1.3. Izražaj PCDH9 u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta

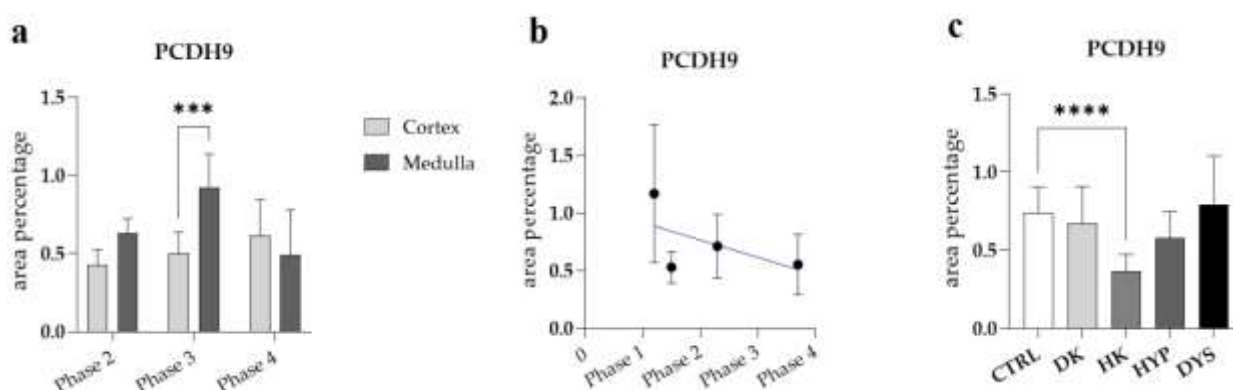
Prostorno-vremenski obrazac bojenja PCDH9 bio je sličan onome za EDA2R te se očitovao kao točkasti zeleni signal, vidljiv u apikalnim i bazalnim membranama stanica mokraćovodnog pupoljka zdravog bubrega u fazi Ph1. Slično tome, kanalići u obliku zareza i kanalići u obliku slova S nisu pokazivali prisutnost bojenja (Slika 11a). PCDH9 je pokazivao umjereno točkasto citoplazmatsko bojenje u tubulima kore, dok je u sabirnim kanalićima bubrežne srži uočen izražen granularni obrazac bojenja (Slika 11c). Debeli i tanki segmenti Henleove petlje također su pokazivali točkasto citoplazmatsko bojenje (Slika 11c).



Slika 11. Imunofluorescencijsko bojenje kore (**a**, **b**) i srži (**c**) zdravog humanog fetalnog bubrega u 10. i 38. razvojnog tjednu (dw) (CTRL) protutijelom na protokadherin 9 (PCDH9). Strelice označavaju obrazac ekspresije PCDH9 u mokraćovodnom pupoljku (ub), kanalićima u obliku

zareza (csb), kanalićima u obliku slova S (ssb), glomerulima (g), proksimalnim zavijenim kanalićima (pct) i distalnim zavijenim kanalićima (dct) u kori bubrega, kao i u sabirnim tubulima (ct) te debelim (tc) i tankim (th) segmentima Henleove petlje u bubrežnoj srži, prikazanim na slici s nuklearnim bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Imunoekspresija preklopljenih mikrofotografija PCDH9 i DAPI u zdravom humanom fetalnom bubregu (MERGE). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Mjerilo je 50 μm , što se odnosi na sve slike. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

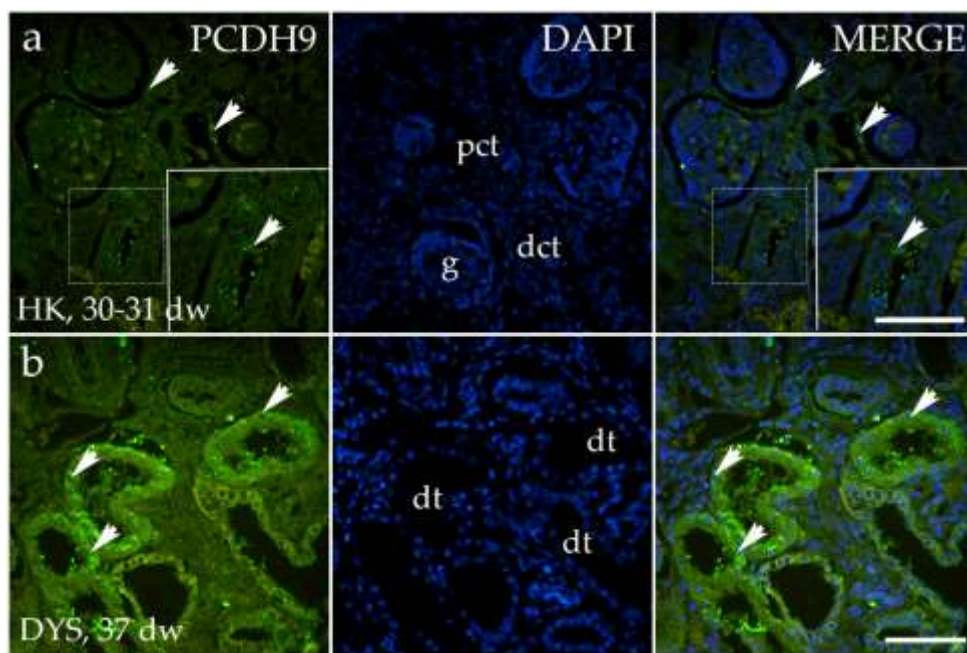
Usporedba postotka PCDH9-pozitivnih stanica u srži i kori zdravih humanih fetalnih bubrega tijekom razvojne faze 3 pokazala je znatno veći udio u srži nego u kori (Slika 12a). Međutim, formalnom analizom linearnog trenda među promatranim razvojnim fazama nije utvrđena statistički značajna razlika ($R^2 = 26,62\%$, $\beta = -0,01506 \pm 0,00957$; Slika 12b).



Slika 12. Postotci površine protokadherina 9 (PCDH9) u kori i srži zdravog humanog fetalnog bubrežnog tkiva tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4 (a). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) te analizirani jednosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Statistički značajne razlike označene su s ***, $p < 0,001$. U svakoj razvojnoj fazi analizirano je deset reprezentativnih slika po promatranom području. Dinamika ekspresije PCDH9 (b) prikazana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem postotaka površine kroz razvojne faze u kori i srži kontrolnih (CTRL) fetalnih bubrega. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Postotci pozitivne površine PCDH9 u fetalnom tkivu bubrega s udvostručenim ureterom (DK), potkovičastih (HK), hipoplastičnih (HYP) i displastičnih (DYS) bubrega prikazani su u (c). Podaci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) te analizirani jednosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Statistički značajne razlike označene su s ****, $p < 0,0001$. U svakoj

vremenskoj točki analizirano je dvadeset reprezentativnih slika. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Obrasci bojenja PCDH9 u kontrolnim bubrezima (CTRL), bubrezima s udvostručenim ureterom (DK) i hipoplastičnim bubrezima (HYP) u velikoj mjeri odgovaraju njihovoj lokalizaciji i intenzitetu (Slika 13a). U displastičnom bubregu PCDH9 je snažno izražen u tubulima uz uočljiv granularni obrazac bojenja (Slika 13b). Bojenje je izostalo u vezivnom tkivu i glomerulima displastičnog bubrega. Analiza postotka PCDH9-pozitivnih stanica u kontrolnim bubrezima i bubrezima zahvaćenima CAKUT-om pokazala je značajno smanjenje udjela PCDH9-pozitivnih stanica u kontrolnim bubrezima u usporedbi s potkovičastim bubrezima ($p < 0,0001$; Slika 13c).

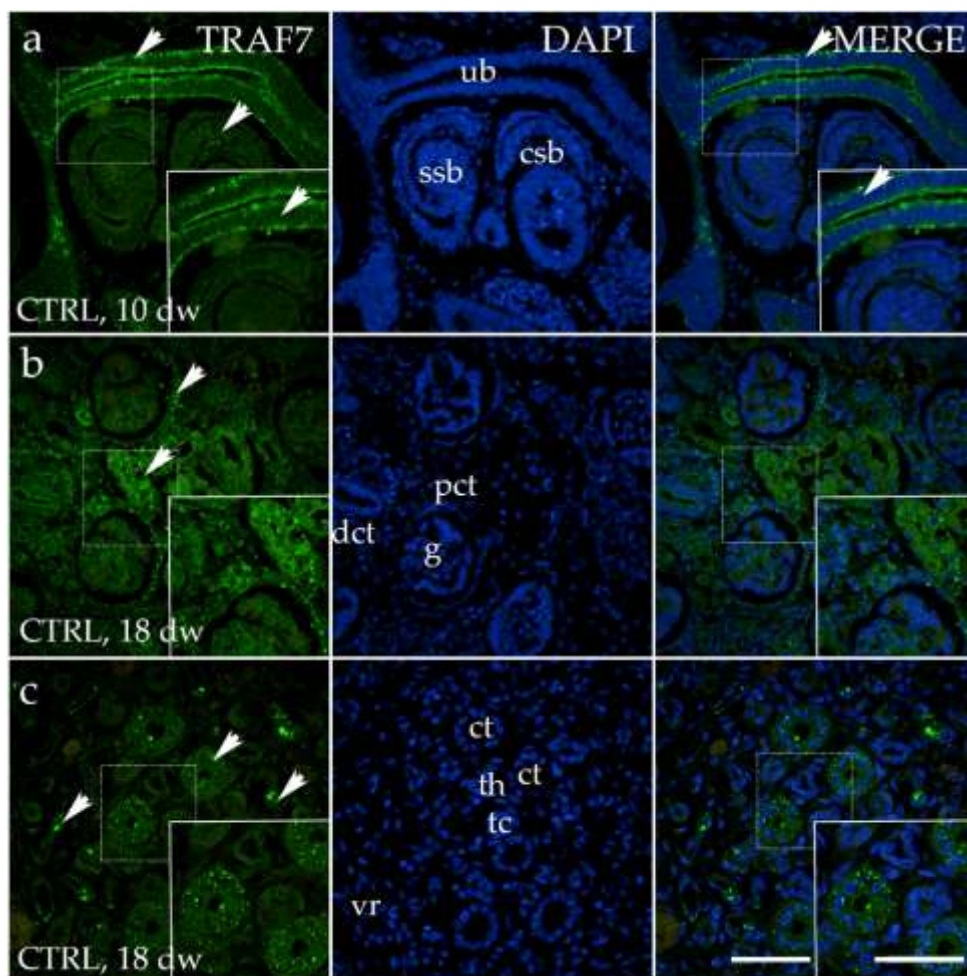


Slika 13. Imunofluorescencijsko bojenje humanih fetalnih bubrega protutijelima na protokadherin 9 (PCDH9) (**a**, **b**). Strelice označavaju obrazac ekspresije PCDH9 u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (dct) i displastičnim tubulima (dt), prikazanim na slici s nuklearnim bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Obrasci bojenja PCDH9 u kontrolnim bubrezima (CTRL), bubrezima s udvostručenim ureterom (DK) i hipoplastičnim bubrezima (HYP) uglavnom se podudaraju u lokalizaciji i intenzitetu, stoga je kao reprezentativna odabrana slika potkovičastog bubrega iz 30.–31. razvojnog tjedna. Prikazana je imunoekspresija PCDH9 i DAPI te njihova preklopljena slika (MERGE) u potkovičastom bubregu (HK) u 30.–31. tjednu (**a**) i displastičnom bubregu (DYS) u 37. tjednu (**b**).

Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Mjerilo je 50 μm , što se odnosi na sve slike. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

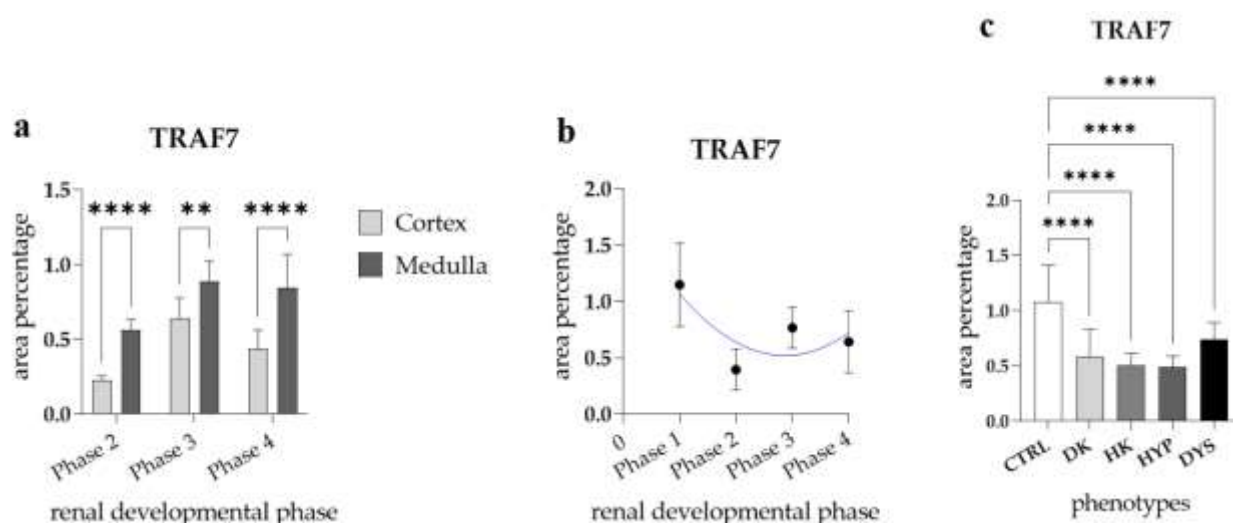
4.1.4. Izražaj TRAF7 u zdravim kontrolama i bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta

Imunohistokemijski obrazac bojenja TRAF7 očitovao se kao jasan difuzni citoplazmatski zeleni signal, izraženiji na apikalnoj strani stanica mokraćovodnog pupoljka zdravih humanih bubrega u razvojnoj fazi 1 (Slika 14a). U kanalićima u obliku zareza i kanalićima u obliku slova S nije uočeno bojenje. U svim vidljivim komponentama nefrogene zone kore bubrega, uključujući glomerule i distalni zavijeni tubul, zabilježeno je jednoliko difuzno citoplazmatsko bojenje. U kasnijim razvojnim fazama prisutni su pozitivni signali u parijetalnom sloju bubrežnog tjelešca te u proksimalnom zavijenom kanaliću jukstamedularne regije kore bubrega (Slika 14b). TRAF7 pokazuje izražen i intenzivan obrazac bojenja u sabirnim tubulima, a ravnomjerno je raspoređen u debelom segmentu Henleove petlje u bubrežnoj srži (Slika 14c).



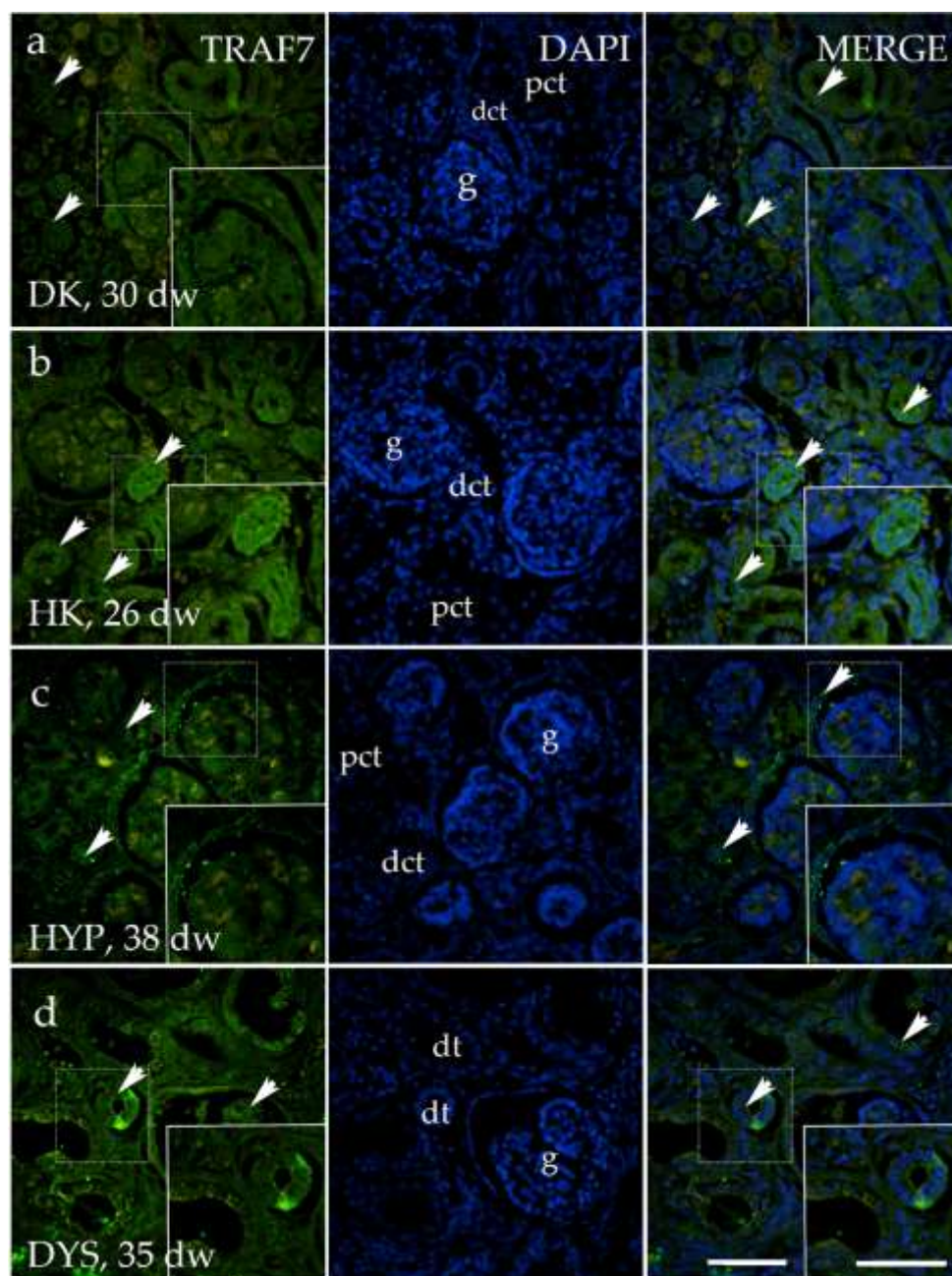
Slika 14. Imunofluorescencijsko bojenje kore (a, b) i srži (c) zdravog humanog fetalnog bubrega u 10. i 18. razvojnog tjednu (dw) (CTRL) protutijelom na faktor 7 povezan s TNF receptorom (TRAF7). Strelice označavaju obrazac ekspresije TRAF7 u mokraćovodnom pupoljku (ub), kanaliću u obliku zarez (csb), kanaliću u obliku slova S (ssb), glomerulima (g), proksimalnim zavijenim kanalićima (pct) i distalnim zavijenim kanalićima (dct) u kori bubrega, kao i u vasa recta (vr), sabirnim tubulima (ct) te debelim (tc) i tankim (th) segmentima Henleove petlje u bubrežnoj srži, prikazanim na slici s nuklearnim bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Imunoekspresija preklopljene slike TRAF7 i DAPI u zdravom humanom fetalnom bubregu (MERGE). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Mjerilo je 50 μ m, što se odnosi na sve slike. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Srž zdravih humanih fetalnih bubrega pokazivala je značajno veći postotak površine TRAF7-pozitivnih stanica u usporedbi s korom u svim promatranim razvojnim fazama ($p < 0,0001$; Slika 15a). Ekspresija TRAF7 u zdravim bubrezima kroz promatrane razvojne faze slijedila je parabolični trend s vrhuncem u fazi Ph1 ($R^2 = 29\%$; Slika 15b). Usporedba postotka površine TRAF7-pozitivnih stanica između kontrolnih bubrega i bubrega zahvaćenih CAKUT-om pokazala je značajno veći udio TRAF7-pozitivnih stanica u kontrolnim bubrezima u odnosu na sve ostale promatrane fenotipove (DK, HK, HYP i DYS) ($p < 0,0001$; Slika 15c).



Slika 15. Postotci pozitivne površine na faktor 7 povezan s TNF receptorom (TRAF7) u kori i srži zdravog humanog fetalnog bubrega tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4 (**a**). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) te analizirani jednosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Statistički značajne razlike označene su s ** $p < 0,01$ i **** $p < 0,0001$. U svakoj razvojnoj fazi analizirano je deset reprezentativnih slika po promatranom području. Dinamika ekspresije TRAF7 (**b**) prikazana je linearnim i nelinearnim regresijskim modeliranjem postotaka površine kroz razvojne faze u kori i srži kontrolnih (CTRL) fetalnih bubrega. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD. Postotci pozitivne površine TRAF7 u fetalnom tkivu bubrega s udvostručenim ureterom (DK), potkovičastih (HK), hipoplastičnih (HYP) i displastičnih (DYS) bubrega prikazani su u **c**. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) te analizirani jednosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Statistički značajne razlike označene su s **** $p < 0,0001$. U svakoj vremenskoj točki analizirano je dvadeset reprezentativnih slika. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Obrasci bojenja TRAF7 u potkovičastim bubrezima (HK), bubrezima s udvostručenim ureterom (DK) i hipoplastičnim bubrezima (HYP) uglavnom odgovaraju njihovoj lokalizaciji i intenzitetu (Slika 16a–c). U displastičnom bubregu TRAF7 je snažno izražen u displastičnim tubulima, dok je slabije izražen u glomerulima i okolnom vezivnom tkivu (Slika 16d).



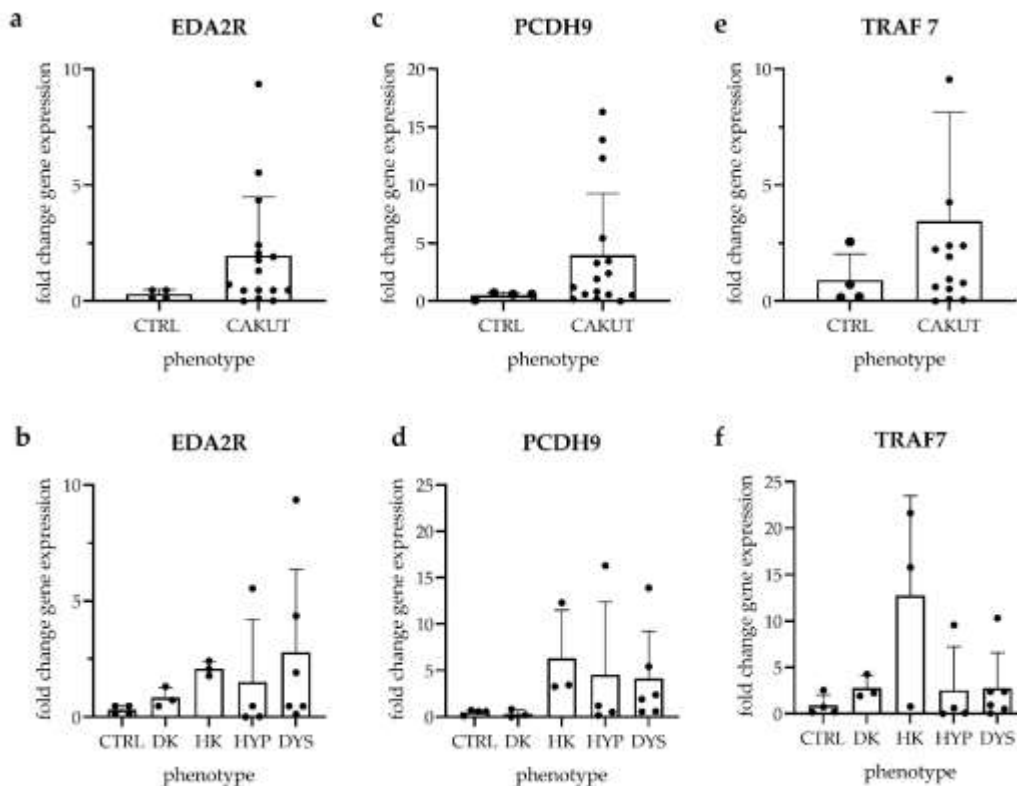
Slika 16. Imunofluorescencijsko bojenje humanih fetalnih bubrega protutijelima na faktor 7 povezan s TNF receptorom (TRAF7) (a–d). Strelice označavaju obrazac ekspresije TRAF7 u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim kanalićima (pct), distalnim zavijenim kanalićima (dct)

i displastičnim tubulima (dt), prikazanim na slici s nuklearnim bojanjem 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Prikazana je imunoekspresija TRAF7 i DAPI te njihova spojena slika (MERGE) u bubregu s udvostručenim ureterom (DK) u 30. razvojnog tjednu (**a**), potkovičastom bubregu (HK) u 26. tjednu (**b**), hipoplastičnom bubregu (HYP) u 38. tjednu (**c**) i displastičnom bubregu (DYS) u 35. tjednu (**d**). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Mjerilo je 50 μm , što se odnosi na sve slike. Prema Kelam et. al, 2024 (1), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

4.1.5. RT-qPCR

Analiza ekspresije gena *EDA2R*, *PCDH9* i *TRAF7* metodom qPCR pokazala je prisutnost trendova prema promijenjenoj ekspresiji u CAKUT uzorcima u odnosu na kontrolne uzorke, iako statistički značajne razlike nisu utvrđene. Usporedba kontrolne skupine i CAKUT uzoraka Mann-Whitney testom nije pokazala značajnu razliku za *EDA2R* ($p = 0,1742$), *PCDH9* ($p = 0,2105$) niti *TRAF7* ($p = 0,4587$). Unatoč tome, u CAKUT uzorcima primijećena je veća varijabilnost ekspresije i pomak prema višim vrijednostima za sva tri gena, što upućuje na moguću biološku heterogenost unutar patološke skupine.

Dodatna analiza pojedinačnih CAKUT fenotipova (DK, HK, HYP i DYS) Kruskal-Wallisovim testom uz Dunnovu post hoc korekciju također nije pokazala statistički značajne razlike između skupina ($p > 0,05$). Međutim, grafički prikaz podataka ukazuje na fenotipski specifične obrasce ekspresije, osobito povišene vrijednosti u pojedinim displastičnim i hipoplastičnim uzorcima, što sugerira postojanje trendova koji bi mogli odražavati stvarne biološke razlike, ali nisu dosegli razinu statističke značajnosti zbog ograničene veličine uzorka i visoke interindividualne varijabilnosti.



Slika 17. Analiza genske ekspresije *EDA2R*, *PCDH9* i *TRAF7* u CAKUT-om pogođenih humanih fetalnih bubrega i kontrolnoj skupini (CTRL). Relativna genska ekspresija (fold change) određena je metodom RT-qPCR za gene *EDA2R* (a, b), *PCDH9* (c, d) i *TRAF7* (e, f). Paneli a, c i e prikazuju razinu ekspresije gena u usporedbi između uzoraka CAKUT-om pogođenih humanih fetalnih bubrega i kontrolne skupine, dok paneli b, d i f prikazuju ekspresiju prema podtipovima CAKUT-a: bubregi s udvostručenim ureterom (DK), potkovičasti bubreg (HK), hipoplazija (HYP) i displazija (DYS). Prikazane su individualne vrijednosti svakog uzorka s ucrtanom srednjom vrijednošću $\pm$ SD. Sve vrijednosti normalizirane su na referentni gen i izražene relativno u odnosu na kontrolnu skupinu. Izvor: autorica.

4.2. Usporedba prostorno-vremenskog izražaja *Eda2r*, *Pcdh9* i *Traf7* proteina u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

U drugom dijelu istraživanja opisani su rezultati imunofluorescencijskog bojenja s *Eda2r*, *Pcdh9* i *Traf7* proteinima na embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa. Lektini *Lotus tetragonolobus* lektin (LTL) i *Dolichos biflorus* aglutinin (DBA) su u ovom istraživanju korišteni kao histokemijski markeri za identifikaciju i razlikovanje pojedinih

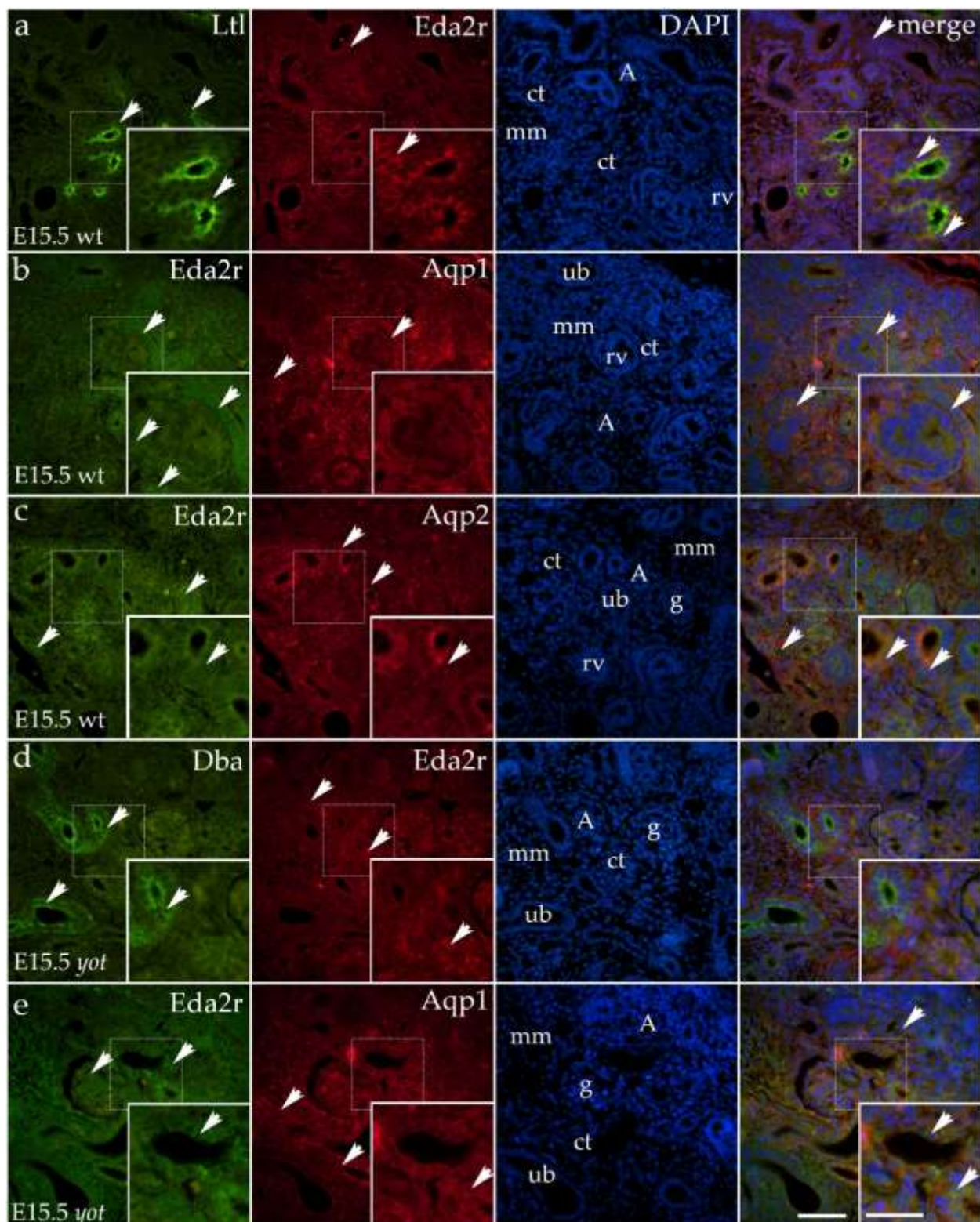
segmenata nefrona te procjenu prostorne organizacije i diferencijacije bubrežnog tkiva tijekom razvoja.

4.2.1. Izražaj Eda2r u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Tijekom embrionalnog dana E13.5 Eda2r protein bio je izraženo lokaliziran na bazolateralnoj membrani mokraćovodnog pupoljka, uz snažno granularno bojenje u ampuli. Točkasti i difuzni citoplazmatski signal uočen je u kondenzacijama metanefrogenog mezenhima i bubrežnim mjehurićima miševa divljeg tipa.

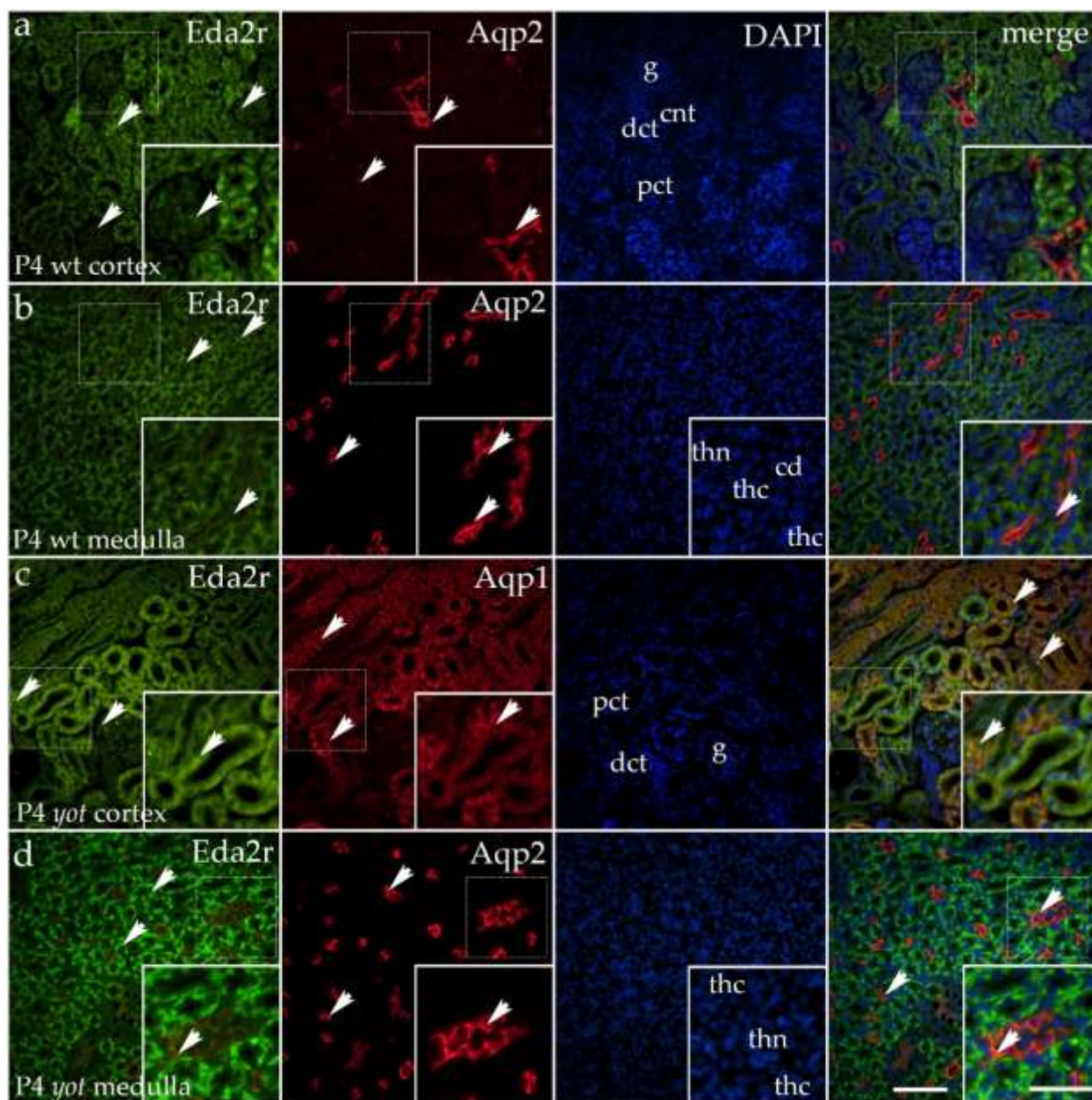
U *yotari* tipu miševa zabilježeno je intenzivno citoplazmatsko bojenje u bubrežnim mjehurićima i metanefrogenom mezenhimu, dok je bojenje u ampuli i mokraćovodnom pupoljku bilo slabije, točkasto i difuzno raspoređeno u citoplazmi.

Embrionalnog dana E15.5 oba genotipa pokazivala su snažno difuzno citoplazmatsko bojenje u zavijenim kanalićima (Slika 18a) i slabo bojenje u bubrežnim mjehurićima (Slika 18b). Granularno bojenje bilo je prisutno i u ampulama, ali smanjenog intenziteta u odnosu na stadij E13.5 (Slika 18a–e).



Slika 18. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miša (yot) embrionalnog dana E15.5 (E15.5) prikazuje Lotus tetragonolobus lektin (LTL), marker diferenciranih proksimalnih tubula ((a,c); zeleno bojenje), i Dolichos biflorus aglutinin (DBA), marker razvijajućih sabirnih kanalića ((b,d); zeleno bojenje), zajedno s receptorom za ektodisplazin A2 (Eda2r) (a–d; crveno bojenje). Embrionalnog dana E15.5 oba genotipa pokazivala su snažno difuzno citoplazmatsko bojenje u zavijenim kanalićima, što je vidljivo na LTL-označenim slikama (a,c), te slabo bojenje u bubrežnim mjehurićima (b). Granularno bojenje zadržalo se u ampulama/mokračovodnom pupoljku, ali smanjenog intenziteta u odnosu na E13.5, uz kolokalizaciju s DBA (b,d). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala LTL, DBA i Eda2r u različitim bubrežnim strukturama, uključujući metanefrogeni mezenhim (mm), bubrežne mjehuriće (RV), glomerule (g), zavijene kanaliće (CT), ampule (A), mokraćovodni pupoljak (ub) i sabirne kanaliće (CD), prikazane na slici s DAPI-bojenim jezgrama (4',6-diamidino-2-fenilindol). Bijele strelice na spojenim slikama LTL, DBA, Eda2r i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, uz skalnu traku od 50 μm primjenjivu na sve slike. Prikazane slike ilustriraju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s markerima specifičnim za pojedine tubularne segmente te ne moraju odražavati prosječni intenzitet signala. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

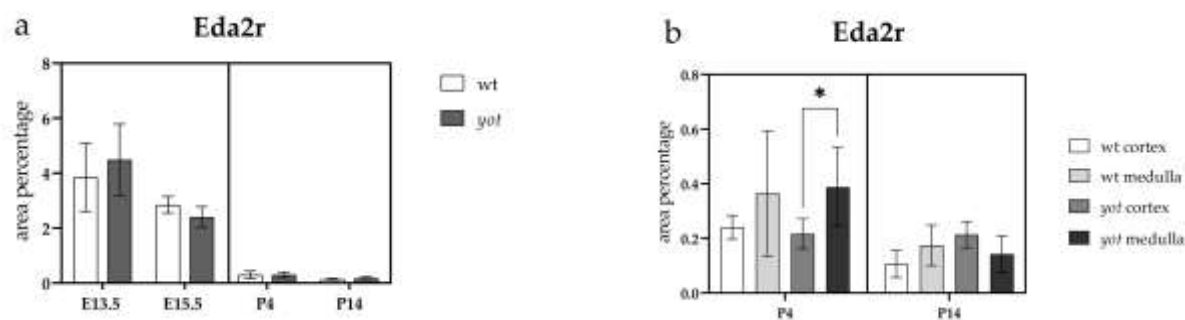
U postnatalnom razdoblju umjereno bojenje uočeno je u visceralnom sloju Bowmanove čahure te sporadično u vaskularnom endotelu (Slika 19a). Bojenje u distalnim zavijenim kanalićima bilo je slabo, difuzno i citoplazmatsko (Slika 19a). U proksimalnim zavijenim kanalićima signal je bio rijedak, ali kada je bio prisutan imao je točkasti izgled i bio lokaliziran na apikalnoj ili bazalnoj membrani kanalića (Slika 19a). Bubrežna srž pokazivala je slabo bojenje u debelim segmentima Henleove petlje, uz povremene pozitivne stanice u tankim segmentima (Slika 19b). Oskudan signal zabilježen je u stanicama sabirnog sustava, uključujući sabirne kanaliće (Slika 19b). U *yotari* mutantima uočen je sličan obrazac bojenja (Slika 19c,d), no uz jednu značajnu razliku, budući da je snažna ekspresija Eda2r detektirana u bubrežnoj srži, osobito u debelim segmentima Henleove petlje (Slika 19d).



Slika 19. Dvostruko imunofluorescentno bojenje korteksa (**a, c**) i medule (**b, d**) bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (yot) na četvrti postnatalni dan (P4) prikazuje receptor za ektodisplazin A2 (Eda2r) ((**a–d**); zeleno bojenje) zajedno s akvaporinom 2 (Aqp2), biljegom glavnih stanica sabirnih kanalića i spojnih kanalića ((**a–d**); crveno bojenje). U miševa divljeg tipa postnatalnog dana 4 (P4), umjereno bojenje uočeno je u visceralnom listu Bowmanove čahure te povremeno u vaskularnom endotelu. Distalni kanalići pokazivali su slabu, difuznu citoplazmatsku obojenost, dok je u proksimalnim kanalićima zabilježen rijedak točkasti signal lokaliziran na apikalnim ili bazalnim membranama (**a**). U srži je slabo bojenje bilo prisutno u debelim segmentima Henleove

petlje, uz povremene signale u tankim segmentima i sabirnim kanalićima (**b**). *Yotari* miševi pokazivali su sličan obrazac (**c**, **d**), ali s izrazito pojačanim bojenjem u debelim segmentima Henleove petlje (**d**). Minimalna kolokalizacija s Aqp2 bila je detektirana (**b**). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala koji odgovara Eda2r i Aqp2 u različitim bubrežnim strukturama, uključujući glomerule (g), proksimalne zavijene kanaliće (PCTs), distalne zavijene kanaliće (DCTs) te spojne kanaliće (CNTs) bubrežne kore, kao i tanke (thn) i debele (thc) segmente Henleove petlje te sabirne kanaliće (CTs) bubrežne srži, vizualizirane na slikama jezgara obojenih 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Bijele strelice na združenim slikama Eda2r, Aqp2 i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavno područje ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, s mjernom crtom od 50 μm primjenjivom na sve slike. Prikazane slike prikazuju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s biljezima specifičnima za pojedine tubularne segmente te ne moraju nužno odražavati prosječni intenzitet signala. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Nismo uočili statistički značajnu razliku u postotku površine Eda2r-pozitivnih stanica između ispitivanih životinjskih fenotipova kroz sve analizirane embrionalne i postnatalne razvojne stadije (Slika 20a).



Slika 20. Kvantifikacija ekspresije receptora za ektodisplazin A2 (Eda2r) u bubrežima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* mutanata (yot) na embrionalne dane 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) te postnatalne dane 4 (P4) i 14 (P14) (**a**). Postotci površine ekspresije Eda2r u kori i srži bubrega wt i *yotari* životinja na P4 i P14 prikazani su u **b**. „Postotak površine” označava udio slike zauzet pozitivnim fluorescentnim signalom, izračunat kao broj fluorescentnih piksela iznad definiranog

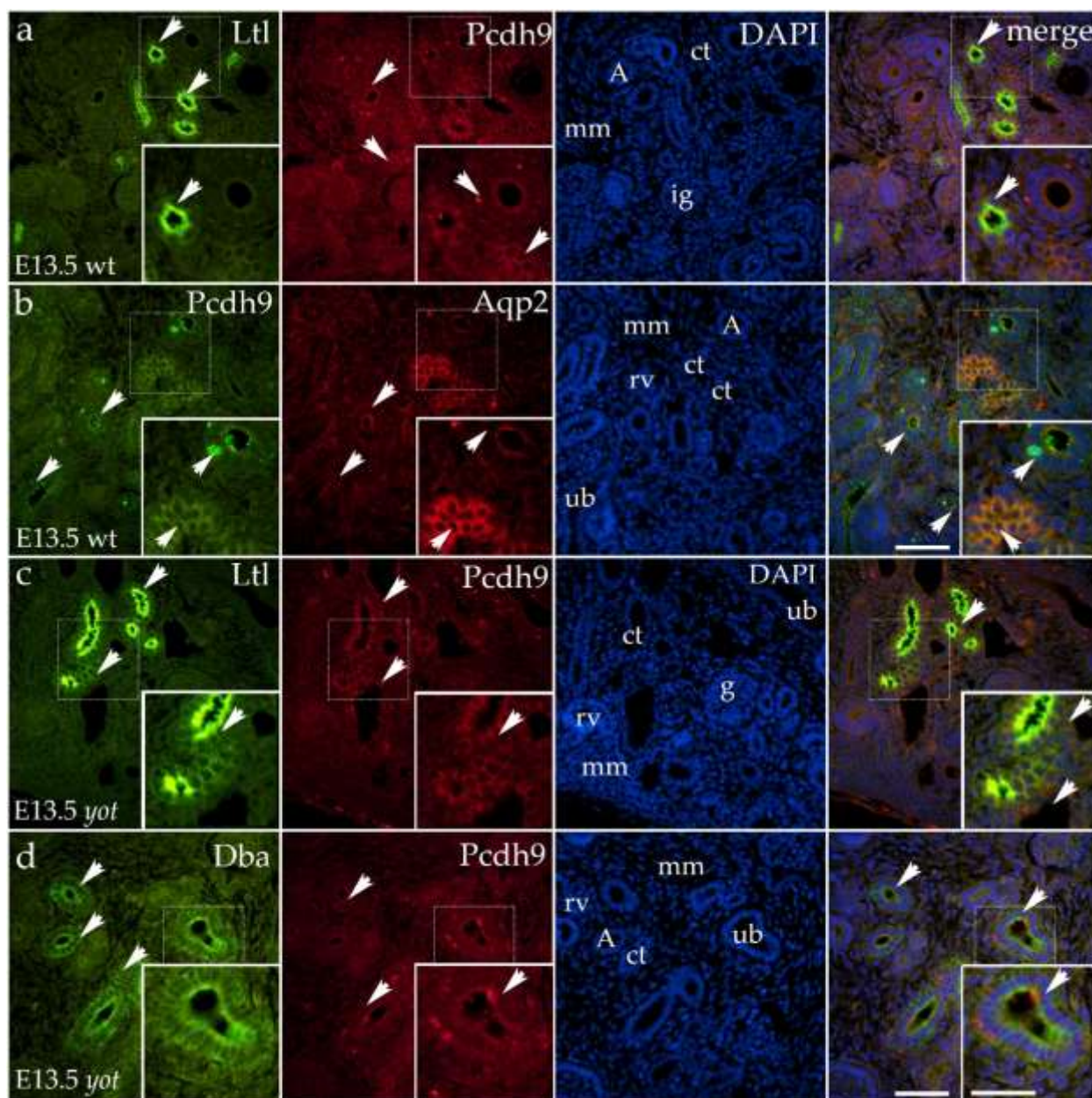
praga podijeljen s ukupnim brojem piksela u slici. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) i analizirani dvosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Za svaki razvojni stadij analizirano je deset reprezentativnih slika po regiji, a rezultati su prosječno prikazani za svaku ispitivanu skupinu. Statistički značajna razlika označena je s * $p < 0,05$. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Na postnatalni dan 4 (P4) zabilježena je statistički značajna razlika u ekspresiji *Eda2r* između kore i srži u *yotari* fenotipu, uz sličan trend kao u životinja divljeg tipa, ali bez postignute statističke značajnosti (Slika 20b).

Na postnatalni dan 14 (P14) ekspresija *Eda2r* pokazivala je tek minimalne razlike između kore i srži u oba ispitivana životinjska fenotipa (Slika 20b).

4.2.2. Izražaj *Pcdh9* u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Pcdh9 pokazuje karakterističan obrazac ekspresije tijekom razvoja bubrega. Snažan, krupan granularni signal prisutan je na bazolateralnim membranama ampula mokraćovodnog pupoljka i sabirnih kanalića (Slika 21a–d). U proksimalnim zavijenim kanalićima ekspresija se očituje kao granularno bojenje na apikalnoj membrani (Slika 21a,c), dok je u ostalim razvijajućim zavijenim kanalićima prisutno slabije, difuzno membransko bojenje (Slika 21a,d).



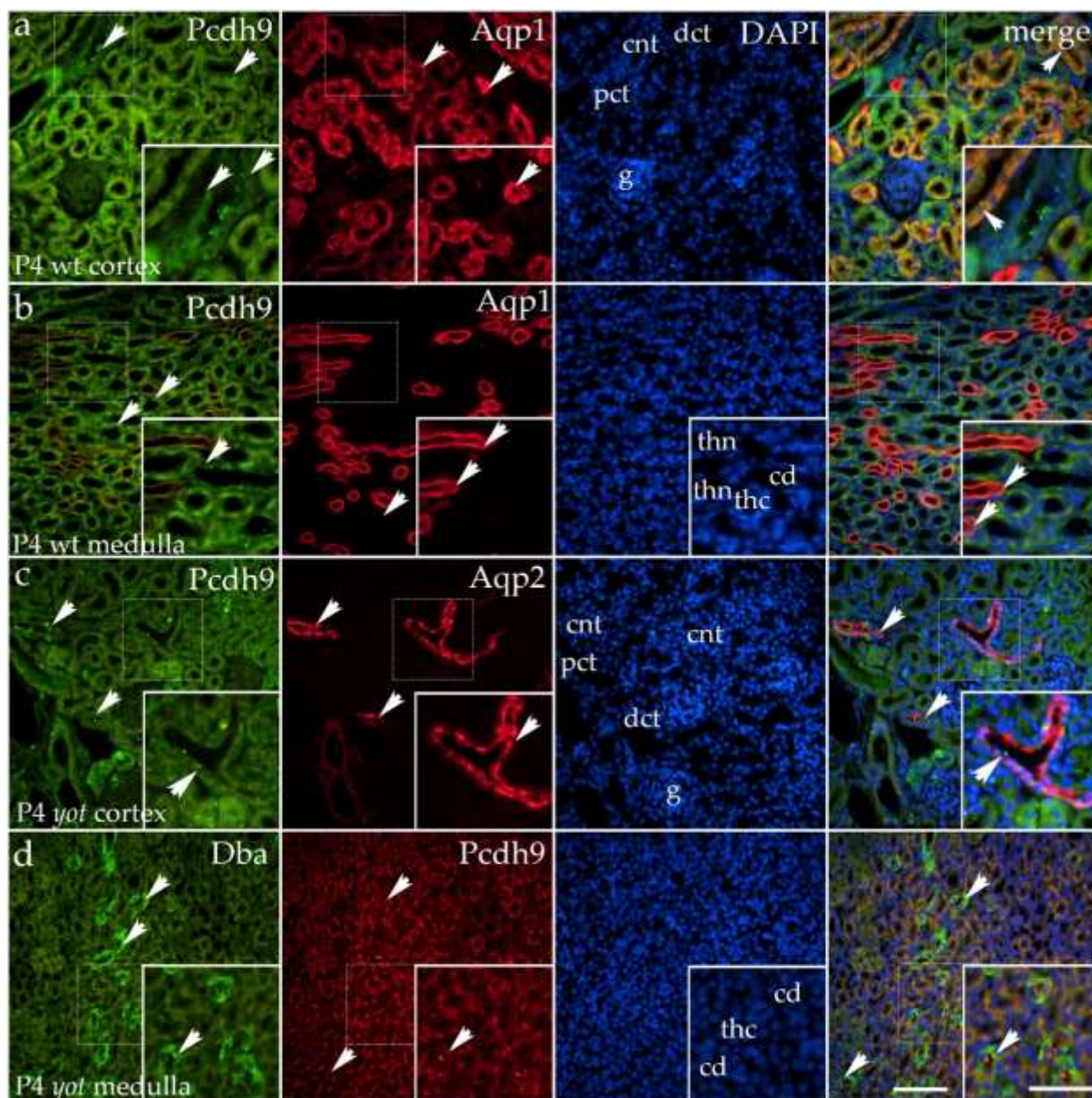
Slika 21. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševa (yot) embrionalnog dana 15.5 (E15.5) prikazuje protokadherin 9 (Pcdh9) ((a–d); zeleno bojenje), zajedno s akvaporinom 1 (Aqp1), koji označava apikalne i bazolateralne membrane stanica proksimalnih kanalića (a,c; crveno bojenje), te akvaporinom 2 (Aqp2), markerom glavnih stanica razvijajućih sabirnih kanalića i derivata mokraćovodnog pupoljka ((b,d); crveno bojenje). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala Pcdh9, Aqp1 i Aqp2 u različitim bubrežnim strukturama, uključujući metanefrogeni mezenhim (mm), bubrežne mjehuriće (RV), glomerule (g), zavijene kanaliće (CT), ampule (A), mokraćovodni pupoljak (ub),

nezrele glomerule (ig) i sabirne kanaliće (CD), prikazane na slikama s jezgrama obojenima 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Snažno, krupno granularno bojenje lokalizirano je na bazolateralnim membranama ampula mokraćovodnog pupoljka i sabirnih kanalića (**a–d**). U proksimalnim zavijenim kanalićima Pcdh9 se očituje kao granularno bojenje na apikalnoj membrani (**a,c**), dok je u ostalim razvijajućim zavijenim kanalićima prisutno slabije, difuzno membransko bojenje (**a,d**). Bijele strelice na spojenim slikama Pcdh9, Aqp1, Aqp2 i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, uz skalnu traku od 50 μm primjenjivu na sve slike. Prikazane slike ilustriraju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s markerima specifičnim za pojedine tubularne segmente te ne moraju odražavati prosječni intenzitet signala. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Tijekom postnatalnog razvoja miševa divljeg tipa uočeno je difuzno citoplazmatsko bojenje u visceralnom sloju Bowmanove čahure (Slika 22a). Dodatno je detektiran snažan točkasti signal na apikalnim membranama spojnih kanalića (Slika 22a). Difuzno citoplazmatsko bojenje bilo je prisutno i u distalnim zavijenim kanalićima, pri čemu je najintenzivniji signal lokaliziran u njihovim bazolateralnim dijelovima. Točkasto bojenje zabilježeno je u vaskularnom endotelu, dok je signal u proksimalnim zavijenim kanalićima bio nepravilno raspoređen (Slika 22a).

U bubrežnoj srži miševa divljeg tipa uočen je izražen granularni signal na apikalnim membranama sabirnih kanalića. Debeli segmenti Henleove petlje pokazivali su difuzno citoplazmatsko bojenje, dok u tankim segmentima signal nije bio detektiran (Slika 22b).

Yotari miš pokazivao je sličan prostorni obrazac ekspresije ispitivanog proteina, ali uz znatno jači intenzitet signala. Na apikalnim membranama spojnih kanalića uočene su veće nakupine Pcdh9 signala u obliku granula, uz difuzno bojenje distalnih zavijenih kanalića (Slika 22c). U bubrežnoj srži *yotari* miševa obrazac bojenja odgovarao je onome u miševa divljeg tipa: granularni signal bio je prisutan na apikalnim membranama sabirnih kanalića, difuzno bojenje u debelim segmentima Henleove petlje te izostanak signala u tankim segmentima (Slika 22d).

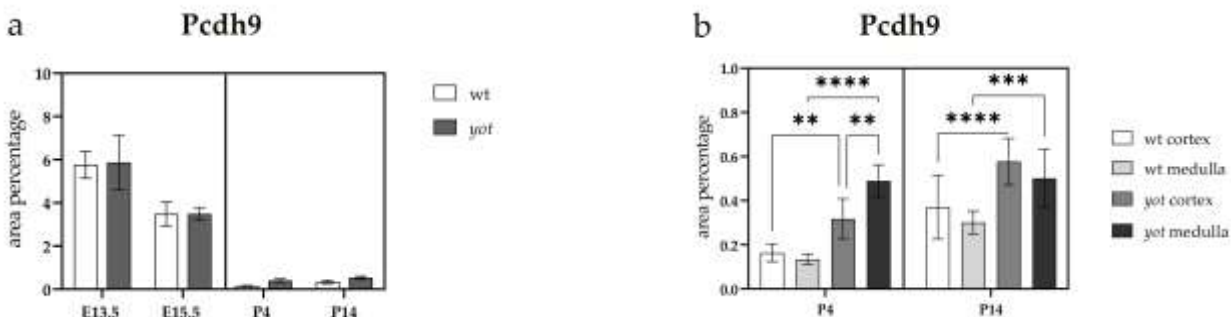


Slika 22. Dvostruko imunofluorescencijsko bojanje kore (**a,c**) i srži (**b,d**) bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševi (yot) na postnatalni dan 4 (P4) prikazuje protokadherin 9 (Pcdh9) ((**a-d**); zeleno bojenje) zajedno s akvaporinom 2 (Aqp2), markerom glavnih stanica sabirnih i spojnih kanalića ((**a-d**); crveno bojenje). U miševa divljeg tipa uočeno je difuzno citoplazmatsko bojenje u visceralnom sloju Bowmanove čahure, uz snažan točkasti signal na apikalnim membranama spojnih kanalića (**a**). Distalni zavijeni kanalići pokazivali su difuzno citoplazmatsko bojenje, najizraženije bazolateralno, dok je točkasti signal bio prisutan u vaskularnom endotelu. Proksimalni kanalići pokazivali su nepravilno raspoređen signal. U bubrežnoj srži snažno

granularno bojenje detektirano je na apikalnim membranama sabirnih kanalića, debeli segmenti Henleove petlje pokazivali su difuzno bojenje, dok u tankim segmentima signal nije uočen (**b**). *Yotari* mutanti pokazivali su sličan prostorni obrazac, ali uz znatno jači intenzitet signala. Uočene su veće apikalne granule u spojnim kanalićima i difuzno bojenje distalnih kanalića, što može upućivati na membranske mikrodomene, vezikule ili endosomalne odjeljke uključene u transport Pcdh9 (**c**). U srži je ekspresija u *yotari* mutantima odražavala obrazac viđen u divljem tipu (**d**). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala Pcdh9 i Aqp2 u različitim bubrežnim strukturama, uključujući glomerule (g), proksimalne zavijene kanaliće (PCT), distalne zavijene kanaliće (DCT), spojne kanaliće (CNT) kore te tanke (thn) i debele (thc) segmente Henleove petlje i sabirne kanaliće (CT) srži, prikazane na slikama s jezgrama obojenima 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Bijele strelice na spojenim slikama Pcdh9, Aqp2 i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, uz skalnu traku od 50 μm primjenjivu na sve slike. Prikazane slike ilustriraju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s markerima specifičnim za pojedine tubularne segmente te ne moraju odražavati prosječni intenzitet signala kvantificiranog na Slici 23. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Postotak površine zauzet Pcdh9-pozitivnim signalom bio je ujednačen, bez statistički značajnih razlika između miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševa (yot) kroz sve analizirane embrionalne i postnatalne razvojne stadije (Slika 23a).

U oba analizirana postnatalna stadija, P4 i P14, zabilježeno je statistički značajno povećanje ekspresije Pcdh9 u kori i srži *yotari* životinja u usporedbi s miševima divljeg tipa (Slika 23b).

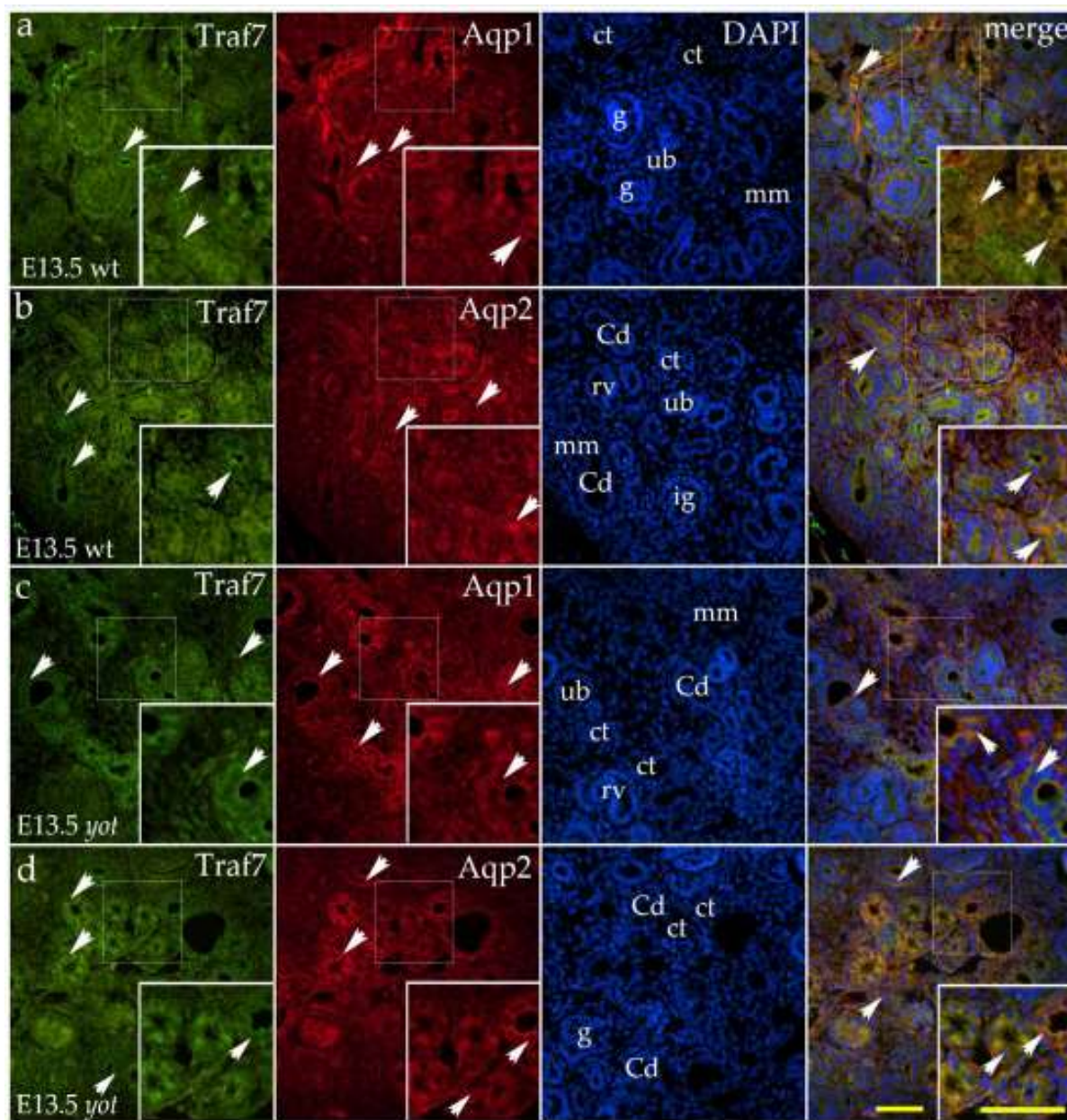


Slika 23. Kvantifikacija ekspresije protokadherina 9 (Pcdh9) u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševa (yot) na embrionalne dane 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) te postnatalne dane 4 (P4) i 14 (P14) (**a**). Postotci površine ekspresije Pcdh9 u kori i srži bubrega wt i *yotari* životinja na P4 i P14 prikazani su u **b**. „Postotak površine” označava udio slike zauzet pozitivnim fluorescentnim signalom, izračunat kao broj fluorescentnih piksela iznad definiranog praga podijeljen s ukupnim brojem piksela u slici. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) i analizirani dvosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Za svaki razvojni stadij analizirano je deset reprezentativnih slika po regiji, a rezultati su prosječno prikazani za svaku ispitivanu skupinu. Statistički značajne razlike označene su s ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

4.2.3. Izražaj Traf7 u embrionalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Na embrionalni dan E13.5 uočeno je snažno točkasto bojenje na bazolateralnim i apikalnim membranama ampula, mokraćovodnog pupoljka i sabirnih kanalića (Slika 24a,b). Blagi difuzni zeleni signal detektiran je u citoplazmi bubrežnih mjehurića, nezrelih glomerula i metanefrogenog mezenhima (Slika 24a).

U *yotari* miševa obrazac bojenja ostao je sličan, uz snažne točkaste signale na membranama ampula i mokraćovodnog pupoljka (Slika 24c). Međutim, difuzno citoplazmatsko bojenje u stanicama bubrežnih mjehurića/nezrelih glomerula (Slika 24c), kao i u mokraćovodnom pupoljku, bilo je izrazito slabije (Slika 24d).



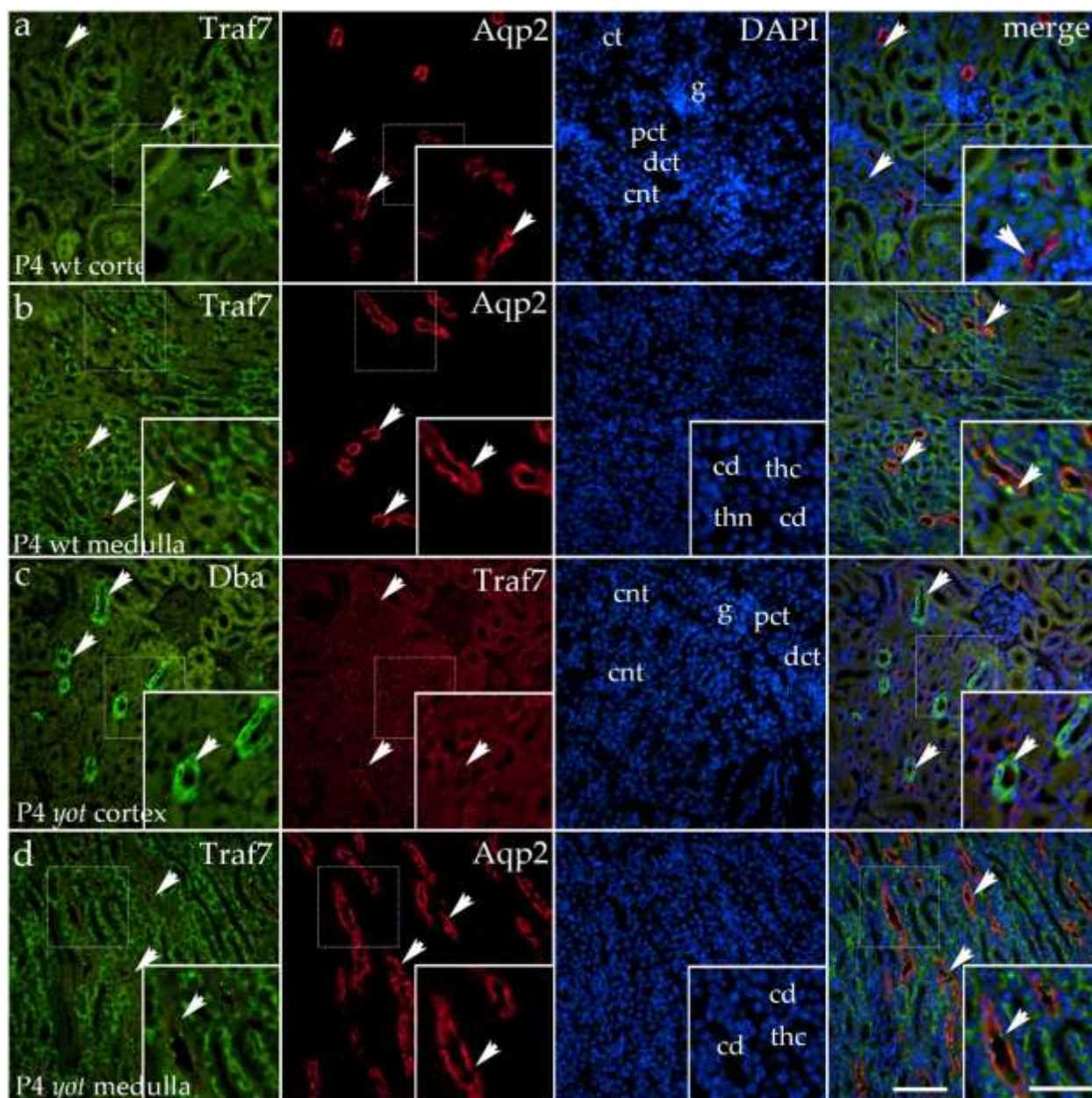
Slika 24. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje bubrega *yotari* miševa (*yot*) i divljeg tipa (*wt*) na embrionalni dan 13.5 (E13.5) prikazuje faktor 7 povezan s TNF receptorom (Traf7) ((a–d); zeleno bojenje), zajedno s akvaporinom 1 (Aqp1), koji označava apikalne i bazolateralne membrane stanica proksimalnih kanalića ((a,c); crveno bojenje), te akvaporinom 2 (Aqp2), markerom glavnih stanica razvijajućih sabirnih kanalića i derivata mokraćovodnog pupoljka ((b,d); crveno bojenje). U embrijima divljeg tipa uočeno je snažno točkasto bojenje na bazolateralnim i apikalnim membranama ampula, mokraćovodnog pupoljka i sabirnih kanalića (a,b). Blagi difuzni citoplazmatski signal detektiran je u bubrežnim mjehurićima, nezrelim

glomerulima i metanefrogenom mezenhimu (**a**). U *yotari* miševi membranski vezano točkasto bojenje ostalo je snažno u ampulama i mokraćovodnom pupoljku (**c**), dok je difuzno citoplazmatsko bojenje u bubrežnim mjehurićima, nezrelim glomerulima i mokraćovodnom pupoljku bilo smanjeno (**c,d**). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala Traf7, Aqp1 i Aqp2 u različitim bubrežnim strukturama, uključujući metanefrogeni mezenhim (mm), bubrežne mjehuriće (RV), glomerule (g), zavijene kanaliće (CT), ampule (A), nezrele glomerule (ig), mokraćovodni pupoljak (ub) i sabirne kanaliće (CD), prikazane na slikama s jezgrama obojenima 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Bijele strelice na spojenim slikama Traf7, Aqp1, Aqp2 i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, uz skalnu traku od 50 μm primjenjivu na sve slike. Prikazane slike ilustriraju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s markerima specifičnim za pojedine tubularne segmente te ne moraju odražavati prosječni intenzitet signala. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

U stadiju E15.5 uočen je usporediv obrazac bojenja, uz dodatno umjereno do snažno točkasto citoplazmatsko bojenje u zavijenim kanalićima. U *yotari* miševa intenzitet bojenja u tim strukturama bio je izraženiji.

Na postnatalni dan 4 (P4) detektirano je blago difuzno citoplazmatsko bojenje u glomerulima, dok je u distalnim zavijenim kanalićima bilo prisutno umjereno difuzno bojenje. Snažan, granularni signal lokaliziran je na apikalnim membranama spojnih kanalića (Slika 25a). Bubrežna srž životinja divljeg tipa pokazivala je umjereno difuzno citoplazmatsko bojenje u debelim segmentima Henleove petlje, blago bojenje u sabirnim kanalićima te snažno, granularno bojenje apikalnih membrana spojnih kanalića. Tanki segmenti Henleove petlje nisu pokazivali pozitivan signal (Slika 25b).

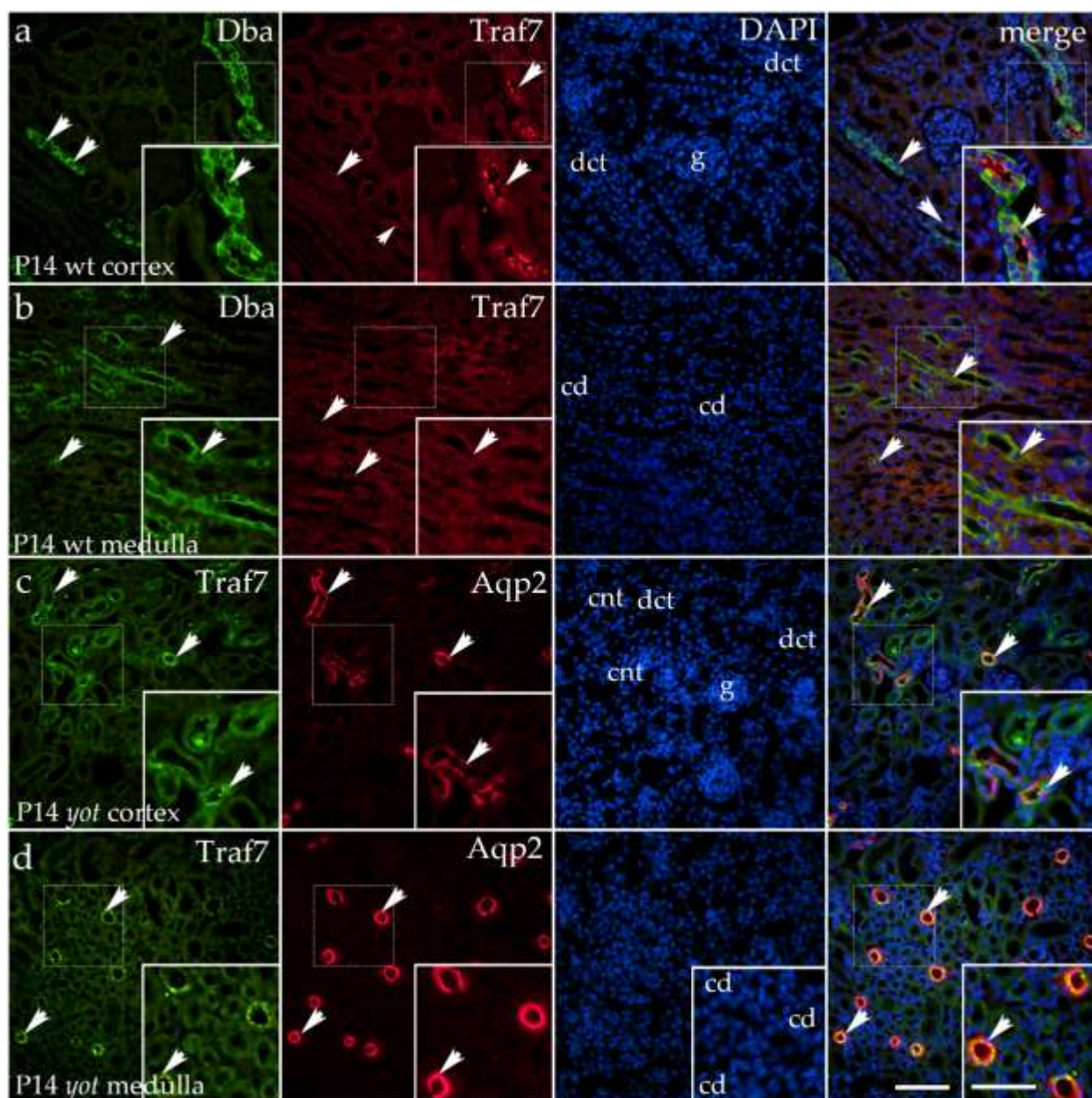
U *yotari* miševa intenzitet bojenja u distalnim zavijenim kanalićima bio je povišen, uz snažan točkasti signal nepravilno raspoređen na apikalnoj membrani kanalića (Slika 25c). Bojenje u glomerulima ostalo je slabo, dok u proksimalnim zavijenim kanalićima signal nije bio detektiran (Slika 25c). U bubrežnoj srži snažno bojenje bilo je prisutno u debelim segmentima Henleove petlje, dok tanki segmenti i sabirni kanalići nisu pokazivali signal (Slika 25d).



Slika 25. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje kore (**a,c**) i srži (**b,d**) bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševa (yot) na postnatalni dan 4 (P4) prikazuje faktor 7 povezan s TNF receptorom (Traf7) ((**a–d**); zeleno bojenje) zajedno s akvaporinom 2 (Aqp2), markerom glavnih stanica sabirnih i spojnih kanalića ((**a–d**); crveno bojenje). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala Traf7 i Aqp2 u različitim bubrežnim strukturama, uključujući glomerule (g), proksimalne zavijene kanaliće (PCT), distalne zavijene kanaliće (DCT), spojne kanaliće (CNT) kore te tanke (thn) i debele (thc) segmente Henleove petlje i sabirne kanaliće (CT) srži, prikazane na slikama s jezgrama obojenima 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). U miševa

divljeg tipa uočeno je blago difuzno citoplazmatsko bojenje u glomerulima, uz umjeren difuzni signal u distalnim zavijenim kanalićima i snažno granularno bojenje apikalnih membrana spojnih kanalića (**a**). U srži je bilo prisutno umjereno difuzno bojenje u debelim segmentima Henleove petlje, blago bojenje u sabirnim kanalićima te snažno granularno apikalno bojenje spojnih kanalića, dok u tankim segmentima signal nije detektiran (**b**). U *yotari* miševa distalni kanalići pokazivali su jače bojenje s nepravilno raspoređenim točkastim signalima na apikalnim membranama (**c**). Bojenje u glomerulima ostalo je slabo, a proksimalni kanalići nisu pokazivali uočljiv signal. U srži je snažno bojenje bilo očuvano u debelim segmentima Henleove petlje, dok tanki segmenti i sabirni kanalići nisu pokazivali signal (**d**). Bijele strelice na spojenim slikama Traf7, Aqp2 i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, uz skalnu traku od 50 μm primjenjivu na sve slike. Prikazane slike ilustriraju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s markerima specifičnim za pojedine tubularne segmente te ne moraju odražavati prosječni intenzitet signala. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

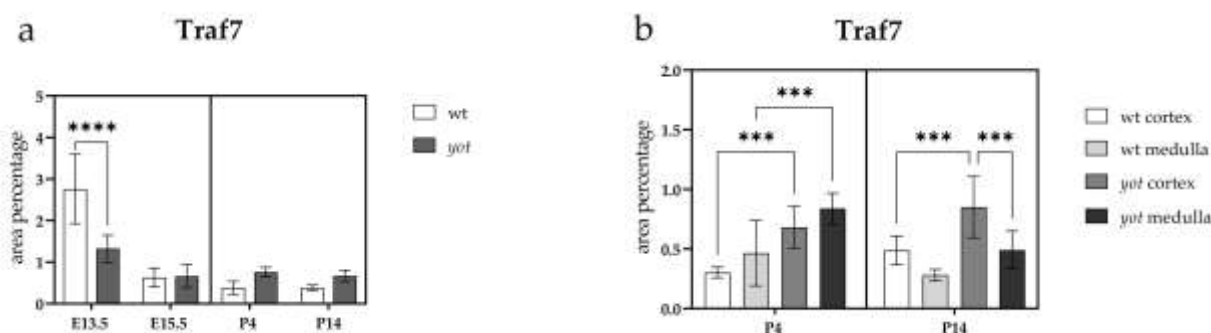
Na postnatalni dan 14 (P14) obrazac bojenja bio je sličan onome opaženom na P4 (Slika 26a–d). Međutim, u *yotari* miševa snažno točkasto bojenje uočeno je i na apikalnoj membrani proksimalnih zavijenih kanalića (Slika 26c). Dodatno, u srži je signal bio prisutan i u tankim i u debelim segmentima Henleove petlje, dok su sabirni kanalići ostali bez uočljivog bojenja (Slika 26d).



Slika 26. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje kore (**a,c**) i srži (**b,d**) bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševa (yot) na postnatalni dan 14 (P14) prikazuje faktor 7 povezan s TNF receptorom (Traf7) ((**a–d**); zeleno bojenje) zajedno s akvaporinom 2 (Aqp2), markerom glavnih stanica sabirnih i spojnih kanalića ((**a–d**); crveno bojenje). Bijele strelice označavaju područja pozitivnog fluorescentnog signala Traf7 i Aqp2 u različitim bubrežnim strukturama, uključujući glomerule (g), proksimalne zavijene kanaliće (PCT), distalne zavijene kanaliće (DCT), spojne kanaliće (CNT) kore te tanke (thn) i debele (thc) segmente Henleove petlje i sabirne kanaliće (CT) srži, prikazane na slikama s jezgrama obojenima 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). U miševa

divljeg tipa obrazac bojenja bio je sličan onome opaženom na P4 (**a,b**). U *yotari* miševa snažno točkasto bojenje pojavilo se na apikalnoj membrani proksimalnih zavijenih kanalića (**c**). U bubrežnoj srži signal je bio prisutan u tankim i debelim segmentima Henleove petlje, dok sabirni kanalići nisu pokazivali uočljivo bojenje (**d**). Bijele strelice na preklapljenim slikama Traf7, Aqp2 i DAPI označavaju područja koekspresije (narančasto bojenje). Umetci koji odgovaraju isprekidanim okvirima prikazuju glavna područja ekspresije proteina. Slike su snimljene pri povećanju $\times 40$, uz skalnu traku od 50 μm primjenjivu na sve slike. Prikazane slike ilustriraju prostornu lokalizaciju i kolokalizaciju s markerima specifičnim za pojedine tubularne segmente te ne moraju odražavati prosječni intenzitet signala kvantificiranog na Slici 27. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

Tijekom embrionalnog dana E13.5 (E13.5) zabilježeno je statistički značajno smanjenje postotka površine prekrivene Traf7-pozitivnim signalom u *yotari* životinja u usporedbi s miševima divljeg tipa ($p < 0,0001$) (Slika 27a). Embrionalnog dana 15.5 (E15.5) i tijekom cijelog postnatalnog razdoblja nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih fenotipova (Slika 27a). Tijekom postnatalnog dana 4 (P4) ekspresija Traf7 bila je značajno viša u kori i srži *yotari* životinja u usporedbi s wt životinjama ($p < 0,001$) (Slika 27b). Na P14 ekspresija Traf7 u srži bila je značajno niža nego u kori kod *yotari* životinja ($p < 0,001$), uz sličan trend u wt životinja, ali bez statističke značajnosti (Slika 27b). Dodatno, u kori bubrega wt životinja zabilježeno je statistički značajno smanjenje postotka Traf7-pozitivne površine u odnosu na *yotari* fenotip (Slika 27b).



Slika 27. Kvantifikacija ekspresije faktora 7 povezanog s TNF receptorom (Traf7) u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* miševa (yot) na embrionalne dane 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) te postnatalne dane 4 (P4) i 14 (P14) (**a**). Postotci površine ekspresije Traf7 u kori i srži bubrega wt

i *yotari* životinja na P4 i P14 (**b**). „Postotak površine” označava udio slike zauzet pozitivnim fluorescentnim signalom, izračunat kao broj fluorescentnih piksela iznad definiranog praga podijeljen s ukupnim brojem piksela u slici. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD (okomite linije) i analizirani dvosmjernom ANOVA-om uz Tukeyjev post hoc test. Za svaki razvojni stadij analizirano je deset reprezentativnih slika po regiji, a rezultati su prosječno prikazani za svaku ispitivanu skupinu. Statistički značajne razlike označene su s *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$. Prema Komić et. al, 2025 (2), preneseno prema licenci Creative Commons CC BY 4.0.

5. RASPRAVA

5.1. Izražaj EDA2R, PCDH9 i TRAF7 u zdravim humanim fetalnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim prirođenim anomalijama bubrega i urotrakta

CAKUT predstavlja značajan javnozdravstveni problem i vodeći je uzrok kronične bubrežne bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Pravodobna primjena ranih terapijskih intervencija ključna je za odgodu potrebe za nadomjesnim bubrežnim liječenjem, a razjašnjavanje genetskih i molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka CAKUT-a od iznimne je važnosti. Ovo istraživanje usmjereno je na analizu prostorne i vremenske ekspresije triju kandidatnih gena te pripadajućih proteina, EDA2R, PCDH9 i TRAF7, koji su u *in silico* studiji Westlanda i suradnika identificirani kao potencijalni geni povezani s poremećajima iz spektra CAKUT-a (130). Prema našim saznanjima do sada nije bila opisana ekspresija ovih proteina tijekom normalnog razvoja ljudskog ili životinjskog bubrega, kao ni u bolesnika s dijagnosticiranim CAKUT-om. Naša je hipoteza da su ovi proteini eksprimirani tijekom razvoja bubrega, što je i potvrđeno njihovim specifičnim obrascima ekspresije tijekom različitih razvojnih faza. Rezultati naše analize pokazali su statistički značajne razlike među razvojnim obrascima, što može pridonijeti prepoznavanju kritičnog razdoblja u kojem *EDA2R*, *TRAF7* i *PCDH9* reguliraju pravilnu maturaciju bubrega te predstavljaju dobru osnovu za daljnja istraživanja povezanosti ovih gena i nastanka poremećaja povezanih s CAKUT-om.

U našoj studiji zabilježena je značajno povećana ekspresija EDA2R u uzorcima bubrežne displazije u odnosu na kontrolne uzorke, što upućuje na moguću ulogu ovog receptora u patogenezi ovog CAKUT fenotipa. EDA2R je poznat kao regulator signalnih putova JNK i NF- κ B, čija aktivacija dovodi do upalnih odgovora i programirane stanične smrti (134, 136). Prethodna istraživanja pokazala su da stimulacija EDA2R može inducirati apoptozu u različitim staničnim populacijama, uključujući epitelne i tumorske stanice, što dodatno podupire pretpostavku o njegovoj ulozi u regulaciji stanične homeostaze (138, 176). S obzirom na to da je apoptoza ključni mehanizam oblikovanja bubrežnog parenhima tijekom razvoja, njezina disregulacija može rezultirati strukturnim abnormalnostima (177). Istraživanje koje su proveli Winyard i sur. utvrdilo je značajno povećanu učestalost apoptoze u stanicama displastičnih humanih bubrega u usporedbi s dobno odgovarajućim zdravim kontrolama (178). Ovu interpretaciju dodatno podupiru rezultati istraživanja dijabetičke nefropatije, gdje je prekomjerna ekspresija EDA2R-a povezana s oksidativnim stresom i apoptozom podocita, što ukazuje na širu patofiziološku ulogu ovog receptora u oštećenju bubrežnog tkiva (144, 179). Ipak, izravna uzročno-posljedična povezanost

između EDA2R signalizacije i razvojnih anomalija bubrega zahtijeva daljnja funkcionalna istraživanja.

Naši rezultati pokazali su sniženu ekspresiju PCDH9 u uzorcima potkovičastog bubrega u usporedbi s kontrolnom skupinom. Taj rezultat može se dovesti u vezu s istraživanjem Zhu i sur., koji su pokazali da PCDH9 inhibira migraciju stanica aktivacijom GSK-3 β te time smanjuje invazivnost tumora u hepatocelularnom karcinomu (153). Smanjena ekspresija PCDH9 mogla bi stoga olakšati aberantnu migraciju stanica preko sagitalne ravnine i spajanje bubrežnih primordija na distalnim polovima. Smatra se da ektopično nefrogeno tkivo nastaje kao posljedica poremećene embrionalne migracije nefrogenih prekursorskih stanica tijekom gastrulacije, odnosno njihove nepravilne raspodjele u ranoj fazi embriogeneze (114, 115, 180). Takva abnormalna migracija mogla bi također objasniti varijabilan sastav istmusa potkovičastog bubrega, koji se sastoji pretežito od bubrežnog parenhima (80–85 %) ili fibrozno vezivnog tkiva (153). Zhu i sur. su dodatno predložili da PCDH9 inhibira epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT) supresijom faktora Snail1 (153). Zanimljivo je da se EMT fiziološki javlja i tijekom embrionalnog razvoja bez tumorigeneze. Tijekom razvoja bubrega mokraćovodni pupoljak, kao epitelna struktura, nastaje ranom mezenhimsko-epitelnom tranzicijom intermedijarnog mezoderma, dok stanice metanefrogenog mezenhima inicijalno izražavaju Snail1 i zadržavaju mezenhimski fenotip. Nakon indukcije mokraćovodnim pupoljkom dolazi do smanjenja ekspresije Snail1, organizacije stanica oko granajućih pupoljaka, njihove agregacije i epitelizacije u bubrežne mjehuriće (181-183). Prekomjeren rast metanefrogenog blastema u potkovičastom bubregu mogao bi biti povezan sa smanjenom ekspresijom PCDH9 i posljedično nedostatnom supresijom Snail1. Za konačno razjašnjenje uloge PCDH9 u EMT tijekom nefrogeneze i u bubrežnoj patologiji potrebna su dodatna istraživanja.

Naše istraživanje pokazalo je da je razina imunološke ekspresije TRAF7 dosljedno viša u bubrežnoj srži u odnosu na koru tijekom svih razvojnih faza. Takva raspodjela TRAF7 zabilježena je i u uzorcima zdravih adultnih bubrega (184). Nedavno istraživanje pokazalo je da je *Traf7* ključan za pravilno formiranje endotela, pri čemu su mišji embriji bez *Traf7* uginuli intrauterino oko embrionalnog dana E10 zbog disfunkcije endotelne stanice (185). Budući da je bubreg izrazito vaskulariziran organ, poremećaji endotelne funkcije mogu imati značajan utjecaj na njegov razvoj i strukturu (186). Prethodna istraživanja pokazala su da endotelne stanice u miša rastu

sinkronizirano s mokraćovodnim pupoljkom već od E10.5, što odgovara četvrtom tjednu ljudske gestacije, a do E13.5 pokazuju znakove diferencijacije i pojavu prvih arterija (187). U ljudskom embriju ti događaji odgovaraju fazi Ph1 razvoja bubrega. Faza Ph3 predstavlja razdoblje u kojem se inducira većina nefrona te dolazi do njihove vaskularizacije tijekom stadija kapilarne petlje, kada endotelne stanice prolaze značajnu morfološku reorganizaciju i razvijaju velike fenestracije (23, 188, 189). Iako se formiranje nefrona i endotela odvija tijekom svih faza razvoja bubrega, naši rezultati pokazuju da je najveći postotak površine imunološke ekspresije TRAF7 prisutan upravo u fazama Ph1 i Ph3. Iz toga se može zaključiti da bi manjak TRAF7 mogao imati najizraženije patološke posljedice upravo tijekom tih kritičnih razvojnih razdoblja.

Naši rezultati također pokazuju da je postotak površine TRAF7 značajno smanjen u svim patološkim bubrezima u usporedbi s kontrolnom skupinom. Mishra-Gorur i sur. proučavali su učinke gubitka *Traf7* u modelima *Xenopus* i zebrice te utvrdili poremećaje formiranja srčane petlje, perikardijalni edem i različite kraniofacijalne malformacije (189). Nadalje, pokazali su da deplecija *Traf7* dovodi do poremećaja ciliogeneze, uz promjene u morfologiji, prostornom rasporedu i broju primarnih i pokretnih cilija (189). Primarne cilije imaju ključnu ulogu u razvoju bubrega te regulaciji diferencijacije i proliferacije epitelnih stanica, a njihova disfunkcija povezana je s brojnim bolestima poznatim pod zajedničkim nazivom ciliopatije (190). Cilija je građena od brojnih proteina koji se u njega transportiraju sustavom intraflagelarnog transporta (IFT), nužnim za održavanje i rast cilija, budući da se sinteza proteina ne odvija unutar samog cilija (191). Mishra-Gorur i sur. pokazali su da *Traf7* ostvaruje interakciju s proteinom IFT57 te da njegova supresija uzrokuje poremećaj sustava intraflagelarnog transporta (189, 190). Poremećaji u strukturi ili funkciji cilija povezani su s nizom bubrežnih sindroma, uključujući autosomno dominantnu i recesivnu policističnu bolest bubrega, Bardet–Biedlov sindrom, nefronoftizu, Senior–Løkenov sindrom, Joubertov sindrom i Meckel–Gruberov sindrom (192). Kakkar i sur. pokazali su da je gotovo polovica analiziranih displastičnih bubrega pripadala skupini multicistične displazije (100). U skladu s tim, naši rezultati koji su pokazali značajno smanjenju ekspresiju TRAF7 u patološkim bubrezima, uključujući displastične uzorke, upućuju na mogućnost da smanjena ekspresija TRAF7 doprinosi poremećaju funkcije primarnih cilija. Međutim, za potvrdu ove pretpostavke potrebna su dodatna eksperimentalna istraživanja.

TRAF7 je također uključen u regulaciju apoptoze putem više signalnih putova, uključujući aktivaciju MEKK3-posredovanog AP1, NF- κ B i C/EBP-homolognog proteina te indukciju kaspaza-ovisne apoptoze (156, 193). Kao što je prethodno istaknuto, poremećena regulacija apoptoze predstavlja važan čimbenik koji utječe na organogenezu (177).

5.2. Izražaj Eda2r, Pcdh9 i Traf7 u embrionalnim i postnatalnim bubrezima miševa divljeg tipa i *yotari* miševa

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati povezanost funkcionalnog utišavanja *Dabl* s trima kandidatnim genima i pripadajućim proteinima, Eda2r, Pcdh9 i Traf7, kako bi se procijenila njihova moguća uloga u signalnim putovima povezanim s Reelin-Dab1 osi. Nastojali smo utvrditi sudjeluju li ovi proteini u Reelin-Dab1 signalizaciji te doprinose li razvoju bubrežne hipoplazije i nastanku CAKUT-a.

Naše istraživanje nije pokazalo značajne razlike u ekspresiji Eda2r između ispitivanih životinjskih fenotipova kroz sve analizirane embrionalne i postnatalne razvojne stadije. Međutim, na postnatalni dan 4 (P4) zabilježena je statistički značajna razlika u ekspresiji Eda2r između kore i srži *yotari* miševa, uz sličan trend u životinja divljeg tipa, iako bez statističke značajnosti. Ovaj nalaz u skladu je s našim prethodnim istraživanjima na humanim embrionalnim uzorcima, u kojima također nisu utvrđene značajne razlike između dvaju bubrežnih odjeljaka u fazi Ph3 razvoja bubrega, koja odgovara P4 u miša (23, 194-196). Nefrogeneza u miša započinje oko E11.5, što odgovara početku Ph1 (5. tjedan) u čovjeka. Stadij E15.5 odgovara približno 15. tjednu razvoja ljudskog bubrega i označava završetak Ph1, dok se razvoj nefrona i bubrežnih struktura nastavlja tijekom Ph2 i Ph3. Završetak nefrogeneze nastupa na prijelazu iz Ph3 u Ph4, što u čovjeka odgovara približno 36. tjednu gestacije, a u miša postnatalnom danu 4 (P4) (194, 195). S obzirom na ujednačenu ekspresiju Eda2r između dvaju genotipova, kao i između pojedinih bubrežnih odjeljaka, može se zaključiti da uvjetna *Dabl*^{-/-} mutacija ne utječe na ekspresiju Eda2r. To upućuje na to da je Eda2r reguliran neovisno, putem alternativnih signalnih putova. Bubrežne abnormalnosti uočene u *yotari* miševa, uključujući hipoplaziju, izravnavanje podocitnih nožica i izostanak filtracijskih pukotina, predstavljaju obilježja razvojne ozljede podocita. Takve promjene, karakteristične za hipoplastične bubrege, proizlaze iz poremećaja razvoja podocita. Lan i sur. pokazali su da prekomjerna ekspresija Eda2r u uvjetima povišene koncentracije glukoze dovodi do ozljede i dediferencijacije podocita (144). Iako oba mehanizma predstavljaju oblik podocitne

ozljede, izostanak pojačane ekspresije *Eda2r* u *yotari* miševa sugerira da je njegova uloga kontekstno ovisna te vjerojatnije povezana s metabolički induciranim oštećenjem nego s razvojnim signalnim putovima.

Postotak površine prekrivene *Pcdh9*-pozitivnim signalom bio je ujednačen kroz sve analizirane embrionalne i postnatalne razvojne stadije, bez statistički značajnih razlika između miševa divljeg tipa i *yotari* životinja. Također je utvrđeno da je ekspresija *Pcdh9* bila viša u embrionalnom razdoblju nego u postnatalnom. Taj obrazac ekspresije u skladu je s našim prethodnim istraživanjima, u kojima je zabilježena negativna korelacija između ekspresije *PCDH9* i razvojne progresije u zdravim humanim embrionalnim i postnatalnim bubrezima (196). Povišena ekspresija *Pcdh9* tijekom embrionalnih stadija, uz njezino postupno smanjenje u postnatalnom razdoblju, sugerira da *Pcdh9* ima važniju ulogu u procesima EMT tijekom morfogeneze bubrega nego u održavanju bubrežne funkcije nakon rođenja.

U oba analizirana postnatalna stadija zabilježena je statistički značajna pojačana ekspresija *Pcdh9* u kori i srži bubrega *yotari* miševa u usporedbi s kontrolama divljeg tipa. Ovaj nalaz djelomično je u skladu s našim prethodnim istraživanjima razvoja humanog bubrega, u kojima je tijekom razvojne faze Ph3 (ekvivalent P4 u miša) utvrđeno statistički značajno smanjenje ekspresije *PCDH9* u kori u odnosu na srž. Međutim, u fazi Ph4 (koja odgovara P14 u miša) nisu zabilježene značajne razlike u ekspresiji *PCDH9* (23, 195, 196).

Povećana ekspresija *Pcdh9* u kori i srži bubrega *yotari* miševa u postnatalnim stadijima P4 i P14, u odnosu na miševe divljeg tipa, može upućivati na kompenzacijski mehanizam usmjeren na ublažavanje poremećenog razvoja bubrega uzrokovanog manjkom *Dab1*. Mutacija *Dab1* u *yotari* miševa remeti Reelin signalizaciju i dovodi do bubrežne hipoplazije (79). *Pcdh9* je povezan s međustaničnom adhezijom i organizacijom citoskeleta te njegova pojačana ekspresija može predstavljati pokušaj očuvanja strukturnog i funkcionalnog integriteta tijekom nefrogeneze (149, 196). Ova pretpostavka u skladu je s istraživanjima koja pokazuju da smanjena ekspresija receptora fibroblastnog čimbenika rasta (FGFR1/FGFR2) u *yotari* bubrezima doprinosi poremećenom razvoju nefrona, dok su signalni putevi Erk1/2 i mTOR dodatno potisnuti, čime se pogoršavaju razvojne abnormalnosti (197). Povećana ekspresija *Pcdh9* također može odražavati adaptivni odgovor na pojačanu autofagijsku aktivnost zabilježenu u *yotari* bubrezima, što potvrđuje povišena ekspresija autofagijskih markera poput LC3B i LAMP2A tijekom postnatalnog

razvoja (198). Dok je smanjena ekspresija PCDH9 u humanim CAKUT modelima povezana s pojačanom migracijom stanica, njegova pojačana ekspresija u *yotari* miševa mogla bi stabilizirati međustanične kontakte i očuvati tkivni integritet u uvjetima razvojnog stresa. Ovi nalazi ukazuju na to da *Pcdh9* ima kontekstno ovisnu ulogu u razvoju i patologiji bubrega te vjerojatno sudjeluje u staničnim odgovorima na promijenjene signalne putove.

U našem istraživanju zabilježeno je značajno smanjenje ekspresije *Traf7* u E13.5 u *yotari* miševa u usporedbi s kontrolama divljeg tipa, što upućuje na to da mutacija *Dab1* djeluje već u ranim fazama razvoja na regulaciju *Traf7*. Prethodna istraživanja povezuju *Traf7* s brojnim razvojnim anomalijama, uključujući poremećaje formiranja srčane petlje te druge srčane, kraniofacijalne i cilijarne abnormalnosti, koje se u bubregu mogu manifestirati pojavom cista i policistične bolesti bubrega (189, 199).

Uspješna nefrogeneza uvelike ovisi o učinkovitoj vaskulogenezi, koja je ključna za formiranje svih bubrežnih struktura i odlikuje se izraženom prostornom i vremenskom dinamikom (200). Vaskularizacija bubrega započinje oko E11, a do E13.5 razvijaju se vaskularni pleksusi u specifičnim regijama, poput nefrogene zone, dok se postojeće endotelne mreže u drugim područjima diferenciraju u prepoznatljive arterijske strukture (187, 201). Titsikov i sur. istaknuli su ključnu ulogu *Traf7* u razvoju endotela (185), pokazavši da *Traf7*^{-/-} mišji embriji ugibaju već oko E10 zbog narušene stabilnosti krvnih žila, što dovodi do intraembrionalnog krvarenja i hipoksije. Nadalje, pokazano je da Reelin, čiji je signalni put funkcionalno povezan s *Dab1*, regulira integritet stijenke krvnih žila utječući na adheziju endotelnih stanica, njihovu morfologiju te membransku otpornost i propusnost (202, 203). U tom kontekstu može se pretpostaviti da *Traf7* predstavlja potencijalni novi element signalne kaskade Reelin puta.

Dodatno, naša prethodna istraživanja pokazala su da je najveći postotak površine TRAF7 zabilježen upravo tijekom Ph1 razvoja u kontrolnim humanim uzorcima (196). Ph1 razvoja ljudskog bubrega, koja obuhvaća gestacijske tjedne 5.-14., vremenski odgovara embrionalnim stadijima E11.5-E15.5 u miša, a vrhunac ekspresije *Traf7* u našem aktualnom istraživanju opažen je na E13.5, odnosno u sredini tog razdoblja (23, 195). Do E15.5 razine ekspresije *Traf7* u *yotari* miševa ponovno su postale usporedive s onima u kontrolama divljeg tipa, uz opći trend pada u obje skupine koji se nastavio tijekom postnatalnog razdoblja. To upućuje na zaključak da je učinak funkcionalno utišanog *Dab1* gena na ekspresiju *Traf7* razvojno stadijski specifičan. Sličan obrazac

postupnog smanjenja ekspresije TRAF7 nakon početne Ph1 zabilježen je i u našim ranijim istraživanjima na humanim uzorcima (196).

Nadalje, naša je istraživačka skupina ranije utvrdila smanjenu ekspresiju TRAF7 u četiri analizirana podtipa CAKUT-a, uključujući i hipoplastični bubreg. Pokazali smo da hipoplastični bubreg ima značajno manji postotak TRAF7-pozitivne površine u odnosu na kontrolne humane embrionalne i fetalne bubrege (196). Racetin i sur. opisali su hipoplastični bubreg kao karakterističan fenotip u *yotari* miševa, a u našem sadašnjem istraživanju smo utvrdili smanjen postotak Traf7-pozitivne površine na E13.5 u usporedbi s kontrolama (204).

Ovi rezultati zajedno upućuju na to da TRAF7 može imati ulogu u normalnom razvoju bubrega, dok njegov manjak potencijalno doprinosi nastanku CAKUT-a, osobito hipoplastičnog bubrega, što je u skladu s našim aktualnim i prethodnim rezultatima (196, 204). Kod P4 zabilježena je statistički značajna razlika u ekspresiji Traf7 između kore i srži *yotari* miševa u odnosu na kontrole, s tendencijom više ekspresije u srži u usporedbi s korom. P4 označava kraj treće faze nefrogeneze u humanim uzorcima, u kojima smo također pokazali veći postotak površine TRAF7 u srži u odnosu na koru (23, 195, 196). Razlike u ekspresiji TRAF7 između kore i srži vjerojatno odražavaju različite funkcije i adaptivne potrebe tih bubrežnih regija. Dodatno, prethodno spomenuta potencijalna stadijsko-specifična uloga Traf7 u razvoju bubrega mogla bi objasniti opći pad postotka površine Traf7 u *yotari* i miševa divljeg tipa. Nakon kritične faze nefrogeneze, ekspresija Traf7 značajno se smanjuje. Ovaj obrazac uočen je i kod drugih proteina i signalnih puteva, poput NOTCH2, koji pokazuje stadijsko-specifičnu ekspresiju, potpuno se utišava nakon sazrijevanja bubrega, a pokazano je i da je povezan sa signalnim putom Reelin-Dab1 (204, 205).

Zanimljivo, Traf7 je tijekom razvoja bubrega pokazivao drugačiji obrazac ekspresije u odnosu na Eda2r i Pcdh9. Kod P14, osobito u *yotari* miševa, Traf7 je pokazivao snažnu točkastu lokalizaciju na apikalnim membranama distalnih i proksimalnih zavijenih kanalića. Ta lokalizacija preklapala se sa segmentima pozitivnima na Aqp2 i DBA, što upućuje na moguću ulogu Traf7 u segmentno specifičnoj epitelnoj diferencijaciji i remodeliranju tubularnog epitela. Takav obrazac u skladu je s predloženom ulogom Traf7 u regulaciji apikalno-bazalne polarizacije i epitelne morfogeneze, sugerirajući da Traf7 može pridonijeti sazrijevanju nefrona utjecajem na diferencijaciju epitelnih stanica i regulaciju transporta membranskih proteina. Ovi nalazi

podudaraju se s ranijim opažanjima da je Traf7 uključen u održavanje endotelne stabilnosti i ciliogenezu, procese ključne za normalan razvoj i funkciju bubrega (185).

Značajno ograničenje našeg istraživanja predstavlja uporaba formalinom fiksiranih i u parafin uklopljenih (FFPE) uzoraka tkiva, što je onemogućilo primjenu komplementarnih metoda poput Western blot analize ili kvantitativnog PCR-a za dodatnu validaciju rezultata. Iako je FFPE očuvanje optimalno za histološku analizu, ono dovodi do degradacije RNA i proteina, čime se navedene tehnike čine neprikladnima za ovu studiju. Slijedom toga, zaključci temeljeni na imunofluorescencijskoj analizi oslanjaju se na kvantifikaciju postotka površine signala, koja je, unatoč standardizaciji i strogo kontroliranoj primjeni, i dalje podložna mogućim eksperimentalnim artefaktima svojstvenima metodi.

Unatoč tome, istraživanje je potkrepljeno opsežnim mjerama kontrole kvalitete, uključujući uporabu pozitivnih i negativnih kontrola, standardizirane protokole snimanja te stručnu verifikaciju morfologije tkiva. Nadalje, zbog ograničenog broja istraživanja o ovim proteinima, osobito u kontekstu nefrogeneze, još uvijek je teško precizno definirati njihovu ulogu u razvoju CAKUT-a. Ipak, naši rezultati predstavljaju čvrstu osnovu za buduća istraživanja u ovom području, koje ima značajan znanstveni i klinički potencijal. Buduće studije trebale bi uključivati opsežnije analize tkiva, ali i komplementarne pristupe, primjerice analizu urina, kako bi se dobio uvid u ključne fiziološke parametre u miševa, uključujući brzinu glomerularne filtracije. Smatramo da navedene mjere osiguravaju pouzdanost naših nalaza u okviru dostupnog materijala i specifičnog fokusa na razvoj bubrega i mehanizme bolesti.

6. ZAKLJUČAK

1. Proteini EDA2R, PCDH9 i TRAF7 pokazuju razvojno regulirane obrasce ekspresije u zdravim humanim fetalnim bubrezima, što upućuje njihovu uključenost u procese nefrogeneze.
2. U bubrezima zahvaćenima CAKUT-om zabilježeni su poremećeni obrasci ekspresije svih triju proteina, što upućuje na njihovu moguću ulogu u patogenezi prirođenih anomalija bubrega i mokraćnog sustava.
3. Povećana ekspresija EDA2R u displastičnim bubrezima u skladu je s njegovim poznatim proapoptotskim mehanizmima te potencijalno pridonosi abnormalnoj regulaciji stanične smrti tijekom razvoja ovog CAKUT fenotipa.
4. Smanjena ekspresija PCDH9 u pojedinim CAKUT fenotipovima može upućivati na poremećaje u međustaničnoj adheziji i epitelno-mezenhimske tranzicije, procesima važnima za pravilnu morfogenezu bubrežnog parenhima.
5. Smanjena ekspresija TRAF7 u hipoplastičnim i displastičnim bubrezima može upućivati na njegovu moguću ulogu u vaskularnom razvoju, ciliogenezi i segmentnoj organizaciji nefrona, čiji poremećaji mogu biti povezani s nastankom CAKUT-a.
6. Razlike u ekspresiji istraživanih proteina između kore i srži ukazuju na regionalnu funkcionalnu specijalizaciju bubrega tijekom razvoja te sugeriraju da su razvojni poremećaji prostorno selektivni.
7. Ekspresija Eda2r bila je ujednačena između *yotari* i kontrolnih životinja kroz sve embrionalne i postnatalne stadije, što ukazuje da funkcionalno utišan *Dab1* ne utječe izravno na izražaj Eda2r te da je njegova ekspresija vjerojatno kontrolirana alternativnim signalnim putovima.
8. *Pcdh9* pokazuje razvojno ovisan obrazac ekspresije, s višim razinama tijekom embrionalne nefrogeneze i postupnim smanjenjem nakon rođenja, što iziskuje potrebu za daljnjim istraživanjima njegove potencijalne uloge u epitelnoj diferencijaciji i morfogenezi bubrega.
9. Povećana postnatalna ekspresija *Pcdh9* u *yotari* miševa upućuje na mogući kompenzacijski mehanizam usmjeren na očuvanje epitelne organizacije i međustanične adhezije u uvjetima poremećene *Dab1* signalizacije.
10. Značajno smanjenje *Traf7* ekspresije u ranoj embrionalnoj fazi (E13.5) u *yotari* miševa ukazuje na stadijski specifičnu osjetljivost *Reelin-Dab1* signalne osi.
11. Prostorne razlike u ekspresiji *Traf7* između kore i srži odražavaju funkcionalnu specijalizaciju bubrežnih odjeljaka i podupiru hipotezu da *Traf7* sudjeluje u segmentno specifičnoj epitelnoj diferencijaciji i sazrijevanju nefrona.

12. Smanjena ekspresija Traf7 povezana je s hipoplastičnim fenotipom bubrega te ga vrijedi dalje istraživati u kontekstu molekularnih mehanizama uključenih u razvoj CAKUT-a, osobito hipoplazije bubrega.
13. Rezultati našeg istraživanja podržavaju rezultate studije Westlanda i suradnika prema kojima su EDA2R, PCDH9 i TRAF7 dio molekularnih mreža koje reguliraju razvoj bubrega.

7. SAŽETAK

Uvod: Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT) predstavljaju jedan od vodećih uzroka kronične bubrežne bolesti u dječjoj dobi i značajan javnozdravstveni problem. Otprilike polovica slučajeva kronične bubrežne bolesti u djece povezana je s CAKUT-om, koji je ujedno vodeći uzrok završnog stadija bubrežne bolesti i potrebe za nadomjesnim bubrežnim liječenjem u pedijatrijskoj populaciji. Razumijevanje genetskih i molekularnih mehanizama koji reguliraju razvoj bubrega ključno je za rasvjetljavanje patogeneze ovih poremećaja.

Materijali i metode: U ovom istraživanju analizirana je ekspresija proteina EDA2R, PCDH9 i TRAF7 u kori i srži zdravih humanih embrionalnih i fetalnih bubrega tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4 te je uspoređena s uzorcima bubrega zahvaćenih CAKUT-om, uključujući udvostručene bubrege (DK), potkovičaste bubrege (HK), hipoplastične bubrege (HYP) i displastične bubrege (DYS). U drugom dijelu istraživanja ispitan je odnos između Reelin-Dab1 signalne osi i ekspresije navedenih proteina u *yotari* (*Dab1*^{-/-}) mišjem modelu, obilježenom razvojem hipoplastičnih bubrega. Analizirana su dva embrionalna stadija (E13.5 i E15.5) te dva postnatalna stadija (P4 i P14).

Rezultati: Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su sva tri proteina fiziološki prisutna tijekom normalnog razvoja bubrega. U displastičnim bubrezima zabilježena je povećana ekspresija EDA2R, što je u skladu s njegovom proapoptotskom ulogom i može doprinijeti poremećenoj regulaciji stanične smrti tijekom razvoja. Smanjena ekspresija PCDH9 u potkovičastim bubrezima povezana je s njegovom ulogom u inhibiciji migracije stanica, pri čemu snižene razine mogu omogućiti aberantnu staničnu migraciju i nepravilnu morfogenezu. Ekspresija TRAF7 bila je smanjena u svim analiziranim CAKUT fenotipovima, što upućuje na njegovu ulogu u razvoju endotela i ciliogenezi, procesima nužnima za pravilnu nefrogenezu. U mišjem modelu, sva tri proteina pokazala su najveći postotak površine ekspresije u ranom embrionalnom stadiju E13.5, nakon čega je uslijedio postupni pad u postnatalnom razdoblju. Za Traf7 je zabilježena statistički značajno manja ekspresija u *yotari* miševa u odnosu na kontrolne životinje u E13.5, što upućuje na stadijski specifičnu povezanost s Reelin-Dab1 signalizacijom i potencijalnu ključnu ulogu u ranoj nefrogenezi. U postnatalnim stadijima zabilježene su regionalne razlike između kore i srži, osobito kod Pcdh9 i Traf7, što sugerira segmentno specifične adaptivne mehanizme u uvjetima poremećenog razvoja.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja ukazuju da EDA2R, PCDH9 i TRAF7 imaju razvojno regulirane i kontekstno ovisne uloge u nefrogenezi te mogu sudjelovati u molekularnim mehanizmima koji dovode do nastanka CAKUT-a. Ovi nalazi predstavljaju temelj za daljnja istraživanja usmjerena na razumijevanje signalnih mreža uključenih u razvoj bubrega i potencijalni razvoj novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa.

8. LAIČKI SAŽETAK

Prirođene anomalije bubrega i mokraćnog sustava ubrajaju se među važne uzroke kronične bubrežne bolesti u djece. Nastaju zbog poremećaja tijekom razvoja bubrega, no molekularni mehanizmi koji dovode do tih poremećaja još nisu u potpunosti razjašnjeni.

U ovom istraživanju analizirana su tri proteina, EDA2R, PCDH9 i TRAF7, za koje se, na temelju prethodnih istraživanja, pretpostavlja da mogu imati ulogu u razvoju bubrega. Njihova prisutnost ispitivana je u zdravim humanim embrionalnim i fetalnim bubrezima te u bubrezima zahvaćenima prirođenim anomalijama, uključujući udvostručeni, potkovičasti, hipoplastični i displastični bubreg. Rezultati su pokazali da su sva tri proteina prisutna tijekom normalnog razvoja bubrega, ali da se njihova ekspresija mijenja u bubrezima zahvaćenima anomalijama. To upućuje na mogućnost da sudjeluju u procesima važnima za pravilan razvoj bubrežnog tkiva.

U drugom dijelu istraživanja analiziran je mišji model *yotari*, za koji je karakteristično postojanje jednog od patoloških forma bubrega (hipoplastični bubreg). Ispitivano je postoji li razlika u ekspresiji navedenih proteina u *yotari* miševa u odnosu na zdrave kontrolne životinje. Utvrđeno je da se ekspresija ovih proteina mijenja tijekom razvoja miša, osobito u ranim embrionalnim stadijima, što upućuje na njihovu moguću važnost u ranom razvoju bubrega.

Ovi rezultati pridonose boljem razumijevanju načina na koji se bubreg normalno razvija i kako poremećaji u tim procesima mogu dovesti do prirođenih anomalija. Dugoročno, takva istraživanja mogu pomoći u razvoju boljih dijagnostičkih i terapijskih pristupa za djecu s prirođenim bolestima bubrega i mokraćnog sustava.

9. SUMMARY

TITLE: SIGNIFICANCE OF THE EXPRESSION OF CANDIDATE GENES FOR CONGENITAL ANOMALIES OF THE KIDNEY AND URINARY TRACT (CAKUT)—*EDA2R*, *PCDH9*, AND *TRAF7*—DURING HUMAN AND MOUSE FETAL AND POSTNATAL DEVELOPMENT

Introduction: Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) represent one of the leading causes of chronic kidney disease in childhood and remain an important public health concern. Approximately half of paediatric chronic kidney disease cases are associated with CAKUT, which is also the primary cause of end-stage kidney disease and the need for renal replacement therapy in the paediatric population. A better understanding of the genetic and molecular mechanisms that guide kidney development is therefore essential for elucidating the pathogenesis of these disorders.

Materials and methods: In this study, we investigated the expression of the proteins *EDA2R*, *PCDH9*, and *TRAF7* in the cortex and medulla of healthy human embryonic and fetal kidneys during developmental phases 2, 3, and 4, and compared these findings with kidneys affected by CAKUT, including duplex (DK), horseshoe (HK), hypoplastic (HYP), and dysplastic (DYS) phenotypes. The second part of the study explored the relationship between Reelin–*Dab1* signalling and the expression of the aforementioned proteins in the *yotari* (*Dab1*^{−/−}) mouse model, which is characterised by renal hypoplasia. Two embryonic stages (E13.5 and E15.5) and two postnatal stages (P4 and P14) were analysed.

Results: All three proteins were present during normal human kidney development. Dysplastic kidneys showed increased *EDA2R* expression, consistent with its known pro-apoptotic activity and suggesting a contribution to altered cell death regulation during development. Reduced *PCDH9* expression in horseshoe kidneys may be related to its role in limiting cell migration, where lower expression could permit abnormal cellular movement and disrupted morphogenesis. *TRAF7* expression was reduced across all examined CAKUT phenotypes, suggesting its importance in endothelial development and ciliogenesis, processes critical for proper nephrogenesis. In the mouse model, for all three proteins, the highest percentage of expression-positive area was observed at E13.5, followed by a gradual decline during the postnatal period. A statistically significantly lower *Traf7* expression was observed in *yotari* mice compared with control animals at E13.5, suggesting a stage-specific association with Reelin–*Dab1* signalling and a potentially

important role of Traf7 in early nephrogenesis. Regional postnatal differences between the cortex and medulla, particularly for Pcdh9 and Traf7, further indicate segment-specific adaptive responses in the setting of disrupted development.

Conclusion: Taken together, these results suggest that EDA2R, PCDH9, and TRAF7 act in developmentally regulated and context-dependent ways during kidney formation and may contribute to molecular pathways underlying CAKUT. The study provides a foundation for future work aimed at mapping signalling networks involved in nephrogenesis and for the long-term development of improved diagnostic and therapeutic strategies.

10. LAY SUMMARY

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract are an important cause of chronic kidney disease in children. These conditions develop when normal kidney formation is disturbed, but the molecular mechanisms behind these abnormalities are still not fully understood.

In this study, three proteins, EDA2R, PCDH9, and TRAF7, were analysed. Based on previous research, these proteins are thought to have a possible role in kidney development. Their expression was analysed in healthy human embryonic and fetal kidneys, as well as in kidneys affected by congenital anomalies, including duplex, horseshoe, hypoplastic, and dysplastic kidneys. The results showed that all three proteins are present during normal kidney development, but their expression changes in kidneys affected by developmental abnormalities. This suggests that these proteins may be involved in processes that are important for proper kidney formation.

The second part of the study focused on the *yotari* mouse model. This model is characterised by one form of abnormal kidney development, namely kidney hypoplasia. The study examined whether the expression of the analysed proteins differed between *yotari* mice and healthy control animals. The findings showed that their expression changes during kidney development, especially in early embryonic stages, suggesting that they may be important for early kidney formation.

Overall, these findings contribute to a better understanding of how the kidney normally develops and how disturbances in this process may lead to congenital kidney and urinary tract anomalies. In the long term, this type of research may support the development of improved diagnostic and therapeutic approaches for children with congenital kidney disorders.

11. LITERATURA

1. Kelam J, Kelam N, Filipović N, Komić L, Racetin A, Komić D, et al. Expression of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) candidate genes EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in normal human kidney development and CAKUT. *Genes (Basel)*. 2024;15(6):702.
2. Komić J, Kelam N, Racetin A, Filipović N, Saraga-Babić M, Ihara D, et al. Spatial and temporal expression patterns of EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in yotari (Dab1^{-/-}) mice: Implications for understanding CAKUT pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2025;26(13):6421.
3. El-Reshaid W, Abdul-Fattah H. Sonographic assessment of renal size in healthy adults. *Med Princ Pract*. 2014;23(5):432–6.7
4. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A, “Systema urinarium, mokraćni sustav”, u: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A, *Anatomija čovjeka*, Medicinska naklada, Zagreb, 2007. Str. 353.-363.
5. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM, „Kidneys and ureters“, u: Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM (ur.), *Gray’s Anatomy for Students*, 4th ed., Elsevier, Philadelphia, 2020, str. 380–400.
6. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR, „Gross anatomy of the urinary system“, u: Moore KL, Dalley AF, Agur AMR (ur.), *Clinically Oriented Anatomy*, 8th ed., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2018, str. 420–435.
7. Ofumwengbe O, Leslie SW. Anatomy, retroperitoneum: Nerve supply to the kidneys. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
8. Hall, John E., „Glomerular filtration, renal blood flow, and their control“, u: Hall, John E. (ur.), *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, Elsevier, Philadelphia, 2021., str. 307–321.
9. Boron, Walter F.; Boulpaep, Emile L., „Regulation of renal blood flow and glomerular filtration rate“, u: Boron, Walter F.; Boulpaep, Emile L. (ur.), *Medical Physiology*, Elsevier, Philadelphia, 2017., str. 815–832.
10. Just A. Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292(1):R1-17.
11. Evans RG, Ince C, Joles JA, Smith DW, May CN, O’Connor PM, et al. Haemodynamic influences on kidney oxygenation: clinical implications of integrative physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(2):106–22.
12. Pallone TL, Zhang Z, Rhinehart K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(2):F253-66.

13. O'Connor PM. Renal oxygen delivery: matching delivery to metabolic demand. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(10):961–7.
14. DiBona GF. Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(2):197–200.
15. Campese VM. Neurogenic factors and hypertension in chronic renal failure. *J Nephrol*. 1997;10(4):184–7.
16. Cheng X, Zhang Y, Chen R, Qian S, Lv H, Liu X, et al. Anatomical evidence for parasympathetic innervation of the renal vasculature and pelvis. *J Am Soc Nephrol*. 2022;33(12):2194–210.
17. Schell C, Wanner N, Huber T. Glomerular development 3 Shaping the multi-cellular filtration unit. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;36.
18. Saxén L. *Organogenesis of the Kidney*. Cambridge University Press; 1987.
19. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
20. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 15th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2024.
21. Wessely O, Tran U. *Xenopus pronephros development--past, present, and future*. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(9):1545–51.
22. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. 6th ed. Elsevier; 2019.
23. Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(5):a008300–a008300.
24. Sariola H. Nephron induction revisited: from caps to condensates. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(1):17–21.
25. Ekblom P. Renal development. U: Seldin DW, Giebisch G, urednici. *Kidney physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press, 1992. 475-501 str.
26. Marciano DK. The bloody mystery of glomerular tuft development. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(9):2104–6.
27. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003;111(5):707–16.
28. Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation*. 2006;74(7):402–21.

29. Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays*. 2006;28(2):117–27.
30. Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996;382(6586):76–9.
31. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996;382(6586):73–6.
32. Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM Jr, et al. GFR α 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron*. 1998;21(2):317–24.
33. Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*. 1993;119(4):1005–17.
34. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995;9(22):2808–20.
35. Perantoni AO, Dove LF, Karavanova I. Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(10):4696–700.
36. Carroll TJ, Park J-S, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell*. 2005;9(2):283–92.
37. Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*. 1995;121(12):4057–65.
38. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22(1):509–29.
39. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*. 1994;372(6507):679–83.
40. Thiagarajan RD, Georgas KM, Rumballe BA, Lesieur E, Chiu HS, Taylor D, et al. Identification of anchor genes during kidney development defines ontological relationships, molecular subcompartments and regulatory pathways. *PLoS One*. 2011;6(2):e17286.
41. Kriz W, Kaissling B. Structural organization of the mammalian kidney. In: Seldin DW, Giebisch G, editors. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 587–654.

42. Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Vilar J, Moreau E, Freund N, Lelièvre-Pégorier M. Nephron number: variability is the rule. Causes and consequences. *Lab Invest.* 1999;79(5):515–27.
43. Hughson M, Farris AB 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int.* 2003;63(6):2113–22.
44. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*: Elsevier Science; 2017.
45. Bankir L, de Rouffignac C. Urinary concentrating ability: insights from comparative anatomy. *Am J Physiol.* 1985;249(6 Pt 2):R643–66.
46. Sands JM, Layton HE. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol.* 2009;29(3):178–95.
47. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove Histologije*. Zagreb: Školska knjiga; 2005. 17 p.
48. Miner JH. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(9):1413–7.
49. Abrahamson DR. Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys. *J Cell Biol.* 1985;100(6):1988–2000.
50. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 2001;108(11):1621–9.
51. Kriz W, Kaissling B. Structural organization of the mammalian kidney. U: Seldin DW, Giebisch G, ur. *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. 5. izd. Elsevier; 2013:595–691.
52. Christensen EI, Wagner CA, Kaissling B. Uriniferous tubule: structural and functional organization. *Compr Physiol.* 2012;2(2):805–61.
53. Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev.* 2000;80(1):277–313.
54. Gomez RA, Sequeira-Lopez MLS. Renin cells in homeostasis, regeneration and immune defence mechanisms. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(4):231–45.
55. Barajas L. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol.* 1979;237(5):F333–43.
56. Kaissling B, Le Hir M. The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(2):247–62.

57. Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature*. 1997;389(6652):733–7.
58. Jossin Y. Reelin functions, mechanisms of action and signaling pathways during brain development and maturation. *Biomolecules*. 2020;10(6):964.
59. Alexander A, Herz J, Calvier L. Reelin through the years: From brain development to inflammation. *Cell Rep*. 2023;42(6):112669.
60. DeSilva U, D'Arcangelo G, Braden VV, Chen J, Miao GG, Curran T, et al. The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. *Genome Res*. 1997;7(2):157–64.
61. D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 1995;374(6524):719–23.
62. Ranaivoson FM, von Daake S, Comoletti D. Structural insights into Reelin function: Present and future. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:137.
63. Frotscher M. Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res*. 1997;290(2):315–22.
64. Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, et al. Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3221–6.
65. D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999;24(2):471–9.
66. Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, et al. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron*. 1999;24(2):481–9.
67. Ballif BA, Arnaud L, Cooper JA. Tyrosine phosphorylation of Disabled-1 is essential for Reelin-stimulated activation of Akt and Src family kinases. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;117(2):152–9.
68. Bock HH, Jossin Y, Liu P, Forster E, May P, Goffinet AM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38772–9.

69. Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K. A novel neurological mutant mouse, yotari, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/Reelin. *Neurosci Res.* 1997;29(3):217–23.
70. Kojima T, Nakajima K, Mikoshiba K. The disabled 1 gene is disrupted by a replacement with L1 fragment in yotari mice. *Mol Brain Res.* 2000;75(1):121–7.
71. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(11):1061–9.
72. Fatemi SH, Snow AV, Stary JM, Araghi-Niknam M, Reutiman TJ, Lee S, et al. Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry.* 2005;57(7):777–87.
73. Imai H, Shoji H, Ogata M, Kagawa Y, Owada Y, Miyakawa T, et al. Dorsal Forebrain-Specific Deficiency of Reelin-Dab1 Signal Causes Behavioral Abnormalities Related to Psychiatric Disorders. *Cereb Cortex.* 2017;27(7):3485–501.
74. Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, et al. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(26):9341–6.
75. Tueting P, Costa E, Dwivedi Y, Guidotti A, Impagnatiello F, Manev R, et al. The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *Neuroreport.* 1999;10(6):1329–34.
76. Segarra M, Aburto MR, Cop F, Llaó-Cid C, Härtl R, Damm M, et al. Endothelial Dab1 signaling orchestrates neuro-glia-vessel communication in the central nervous system. *Science.* 2018;361(6404):eaao2861.
77. Cao R-J, Li K, Xing W-Y, Du S, Li Q, Zhu X-J, et al. Disabled-1 is down-regulated in clinical breast cancer and regulates cell apoptosis through NF- κ B/Bcl-2/caspase-9. *J Cell Mol Med.* 2019;23(2):1622–7.
78. Li L, Hao J, Yan C-Q, Wang H-F, Meng B, Cai S-Y. Inhibition of microRNA-300 inhibits cell adhesion, migration, and invasion of prostate cancer cells by promoting the expression of DAB1. *Cell Cycle.* 2020;19(21):2793–810.
79. Racetin A, Jurić M, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Glavina Durdov M, et al. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. *Croat Med J.* 2019;60(6):521–31.

80. Yerkes E, Nishimura H, Miyazaki Y, Tsuchida S, Brock JW 3rd, Ichikawa I. Role of angiotensin in the congenital anomalies of the kidney and urinary tract in the mouse and the human. *Kidney Int Suppl.* 1998;67:S75-7.
81. Nakanishi K., Yoshikawa N. Genetic disorders of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) *Pediatr. Int.* 2003;45:610–616.
82. Murugapoopathy V, Gupta IR. A primer on congenital anomalies of the kidneys and urinary tracts (CAKUT). *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(5):723–31.
83. Prenatal detection rates charts [Internet]. European Commission. Available online: https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prenatal-screening-and-diagnosis_en#inline-nav-1 (accessed on 18 March 2025)
84. NCARDS Congenital Anomaly Official Statistics Report, 2020 [Internet]. NHS England. Available online: <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/ncards-congenital-anomaly-statistics-annual-data/ncards-congenital-anomaly-statistics-report-2020/prevalence-of-major-anomaly-subgroups> (accessed on 18 March 2025)
85. Virth, J.; Mack, H.G.; Colville, D.; Crockett, E.; Savage, J. Ocular manifestations of congenital anomalies of the kidney 407 and urinary tract (CAKUT). *Pediatr Nephrol* 2024, 39, 357-369, doi:10.1007/s00467-023-06068-9.
86. Knoers N. The term CAKUT has outlived its usefulness: the case for the defense. *Pediatr Nephrol.* 2022;37(11):2793-8. Epub 2022/07/23.
87. Madariaga L, Moriniere V, Jeanpierre C, Bouvier R, Loget P, Martinovic J, et al. Severe prenatal renal anomalies associated with mutations in HNF1B or PAX2 genes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(7):1179-87. Epub 2013/03/30.
88. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(3):363–73.
89. Bergman JEH, Perraud A, Barišić I, Kinsner-Ovaskainen A, Morris JK, Tucker D, et al. Updated EUROCAT guidelines for classification of cases with congenital anomalies. *Birth Defects Res.* 2024;116(2):e2314.
90. Bonsib SM. Renal hypoplasia, from grossly insufficient to not quite enough: Consideration for expanded concepts based upon the author’s perspective with historical review: Consideration for expanded concepts based upon the author’s perspective with historical review. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(5):311–30.

91. 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.
92. Kanasawa M, Moller J, Good RA, Vernier RL. Dwarfed kidneys in children. The classification, etiology, and significance of bilateral small kidneys in 11 children. *Am J Dis Child.* 1965;109:130–40.
93. 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. *J Pediatr.* 1961;58(3):356–66.
94. Broyer M, Soto B, Gagnadoux MF, Adi M, Rica C, Gubler MC. Oligomeganephronic renal hypoplasia. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1997;26:47–63.
95. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens [Internet].* 1988;1(4 Pt 1):335–47.
96. Fogo AB. Glomerular hypertension, abnormal glomerular growth, and progression of renal diseases. *Kidney Int Suppl.* 2000;75:S15-21.
97. Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet.* 2007;8(10):791–802.
98. Luyckx VA, Brenner BM. Clinical consequences of developmental programming of low nephron number. *Anat Rec (Hoboken).* 2020;303(10):2613–31.
99. Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJD. Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(4):998–1007.
100. Kakkar N, Menon S, Radotra BD. Histomorphology of renal dysplasia--an autopsy study. *Fetal Pediatr Pathol.* 2006;25(2):73–86.
101. Didier RA, Chow JS, Kwatra NS, Retik AB, Lebowitz RL. The duplicated collecting system of the urinary tract: embryology, imaging appearances and clinical considerations. *Pediatr Radiol.* 2017;47(11):1526–38.
102. Khatib N, Bronshtein M, Bachar G, Beloosesky R, Ginsberg Y, Zmora O, et al. Fetal renal duplicated collecting system at 14-16 weeks of gestation. *J Clin Med.* 2023;12(22):7124.
103. Whitten SM, Wilcox DT. Duplex systems. *Prenat Diagn.* 2001;21(11):952–7.
104. Kozlov VM, Schedl A. Duplex kidney formation: developmental mechanisms and genetic predisposition. *F1000Res.* 2020;9:2.

105. Glassberg KI, Braren V, Duckett JW, Jacobs EC, King LR, Lebowitz RL, et al. Suggested terminology for duplex systems, ectopic ureters and ureteroceles. *J Urol*. 1984;132(6):1153–4.
106. Dorko F, Tokarčík J, Výborná E. Congenital malformations of the ureter: anatomical studies. *Anat Sci Int*. 2016;91(3):290–4.
107. Weigert C. Ueber einige Bildungsfehler der Ureteren. *Virchows Arch*. 1877;70(4):490–501.
108. Meyer R. Normal and abnormal development of the ureter in the human embryo; a mechanistic consideration. *Anat Rec*. 1946;96(4):355–71.
109. Lange-Sperandio B, Anders H-J, Stehr M, Chevalier RL, Klaus R. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: A continuum of care. *Semin Nephrol*. 2023;43(4):151433.
110. Fernbach SK, Feinstein KA, Spencer K, Lindstrom CA. Ureteral duplication and its complications. *Radiographics*. 1997;17(1):109–27.
111. Świętoń D, Buczkowski K, Czarniak P, Gołębiewski A, Grzywińska M, Kujawa MJ, et al. Insights into kidney dysplasia in duplex kidneys: From radiologic diagnosis to histopathologic understanding. *Biomedicines*. 2024;12(5):1126.
112. Bascietto F, Khalil A, Rizzo G, Makatsariya A, Buca D, Silvi C, et al. Prenatal imaging features and postnatal outcomes of isolated fetal duplex renal collecting system: A systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn*. 2020;40(4):424–31.
113. Humphries A, Speroni S, Eden K, Nolan M, Gilbert C, McNamara J. Horseshoe kidney: Morphologic features, embryologic and genetic etiologies, and surgical implications. *Clin Anat*. 2023;36(8):1081–8.
114. Doménech-Mateu JM, Gonzalez-Compta X. Horseshoe kidney: a new theory on its embryogenesis based on the study of a 16-mm human embryo: HORSESHOE KIDNEY MORPHOGENESIS. *Anat Rec*. 1988;222(4):408–17.
115. Taghavi K, Kirkpatrick J, Mirjalili SA. The horseshoe kidney: Surgical anatomy and embryology. *J Pediatr Urol*. 2016;12(5):275–80.
116. Balawender K, Cisek A, Cisek E, Orkisz S. Anatomical and Clinical Aspects of Horseshoe Kidney: A Review of the Current Literature Aspectos Anatómicos y Clínicos del Riñón en Herradura: Una Revisión de la Literatura Actual [Internet]. *Scielo.cl*. [cited 2026 Mar 27]. Available from: <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v37n1/0717-9502-ijmorphol-37-01-00012.pdf>

117. Hohenfellner M, Schultz-Lampel D, Lampel A, Steinbach F, Cramer BM, Thüroff JW. Tumor in the horseshoe kidney: clinical implications and review of embryogenesis. *J Urol.* 1992;147(4):1098–102.
118. Glodny B, Petersen J, Hofmann KJ, Schenk C, Herwig R, Trieb T, et al. Kidney fusion anomalies revisited: clinical and radiological analysis of 209 cases of crossed fused ectopia and horseshoe kidney. *BJU Int.* 2009;103(2):224–35.
119. O'Brien J, Buckley O, Doody O, Ward E, Persaud T, Torreggiani W. Imaging of horseshoe kidneys and their complications. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2008;52(3):216–26.
120. Buntley D. Malignancy associated with horseshoe kidney. *Urology.* 1976;8(2):146–8.
121. Stimac G, Dimanovski J, Ruzic B, Spajic B, Kraus O. Tumors in kidney fusion anomalies--report of five cases and review of the literature. *Scand J Urol Nephrol.* 2004;38(6):485–9.
122. Kolvenbach CM, Shril S, Hildebrandt F. The genetics and pathogenesis of CAKUT. *Nat Rev Nephrol.* 2023;19(11):709–20.
123. Vivante A, Kohl S, Hwang D-Y, 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.
124. Nicolaou N, Renkema KY, Bongers EMHF, Giles RH, Knoers NVAM. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(12):720–31.
125. van der Ven AT, Vivante A, Hildebrandt F. Novel insights into the pathogenesis of monogenic congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(1):36–50.
126. Verbitsky M, Westland R, Perez A, Kiryluk K, Liu Q, Krithivasan P, et al. The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nat Genet.* 2019;51(1):117–27.
127. Caruana G, Wong MN, Walker A, Heloury Y, Webb N, Johnstone L, et al. Copy-number variation associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(3):487–95.
128. Sanna-Cherchi S, Kiryluk K, Burgess KE, Bodria M, Sampson MG, Hadley D, et al. Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations. *Am J Hum Genet.* 2012;91(6):987–97.

129. Merz LM, Kolvenbach CM, Wang C, Mertens ND, Seltzsam S, Mansour B, et al. Trio exome sequencing identifies de novo variants in novel candidate genes in 19.62% of CAKUT families. *Genet Med*. 2025;27(7):101432.
130. Westland R, Verbitsky M, Vukojevic K, Perry BJ, Fasel DA, Zwijsenburg PJG, et al. Copy number variation analysis identifies novel CAKUT candidate genes in children with a solitary functioning kidney. *Kidney Int*. 2015;88(6):1402–10.
131. Mikkola ML, Pispá J, Pekkanen M, Paulin L, Nieminen P, Kere J, et al. Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech Dev*. 1999;88(2):133–46.
132. Bayes M, Hartung AJ, Ezer S, Pispá J, Thesleff I, Srivastava AK, et al. The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet*. 1998;7(11):1661–9.
133. Yan M, Wang LC, Hymowitz SG, Schilbach S, Lee J, Goddard A, et al. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science*. 2000;290(5491):523–7.
134. Sinha SK, Zachariah S, Quiñones HI, Shindo M, Chaudhary PM. Role of TRAF3 and -6 in the activation of the NF-kappa B and JNK pathways by X-linked ectodermal dysplasia receptor. *J Biol Chem*. 2002;277(47):44953–61.
135. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012;26(3):203–34.
136. Verhelst K, Gardam S, Borghi A, Kreike M, Carpentier I, Beyaert R. XEDAR activates the non-canonical NF-κB pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;465(2):275–80.
137. Barbera MC, Guarrera L, Re Cecconi AD, Cassanmagnago GA, Vallergera A, Lunardi M, et al. Increased ectodysplasin-A2-receptor EDA2R is a ubiquitous hallmark of aging and mediates parainflammatory responses. *Nat Commun*. 2025;16(1):1898.
138. Chang B, Punj V, Shindo M, Chaudhary PM. Adenoviral-mediated gene transfer of ectodysplasin-A2 results in induction of apoptosis and cell-cycle arrest in osteosarcoma cell lines. *Cancer Gene Ther*. 2007;14(11):927–33.
139. Sisto M, Lorusso L, Lisi S. X-linked ectodermal dysplasia receptor (XEDAR) gene silencing prevents caspase-3-mediated apoptosis in Sjögren's syndrome. *Clin Exp Med*. 2017;17(1):111–9.

140. Brosh R, Sarig R, Natan EB, Molchadsky A, Madar S, Bornstein C, et al. p53-dependent transcriptional regulation of EDA2R and its involvement in chemotherapy-induced hair loss. *FEBS Lett.* 2010;584(11):2473–7.
141. Tanikawa C, Ri C, Kumar V, Nakamura Y, Matsuda K. Crosstalk of EDA-A2/XEDAR in the p53 signaling pathway. *Mol Cancer Res.* 2010;8(6):855–63.
142. Freire-Maia N. Ectodermal dysplasias. *Hum Hered.* 1971;21(4):309–12.
143. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, et al. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat.* 2011;32(1):70–2.
144. Lan X, Kumar V, Jha A, Aslam R, Wang H, Chen K, et al. EDA2R mediates podocyte injury in high glucose milieu. *Biochimie.* 2020;174:74–83.
145. Morishita H, Yagi T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):584–92.
146. Asahina H, Masuba A, Hirano S, Yuri K. Distribution of protocadherin 9 protein in the developing mouse nervous system. *Neuroscience.* 2012;225:88–104.
147. Frank M, Kemler R. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):557–62.
148. Strehl S, Glatt K, Liu QM, Glatt H, Lalande M. Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14. *Genomics.* 1998;53(1):81–9.
149. Zhang J, Yang H-Z, Liu S, Islam MO, Zhu Y, Wang Z, et al. PCDH9 suppresses melanoma proliferation and cell migration. *Front Oncol.* 2022;12:903554.
150. Lv J, Zhu P, Zhang X, Zhang L, Chen X, Lu F, et al. PCDH9 acts as a tumor suppressor inducing tumor cell arrest at G0/G1 phase and is frequently methylated in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):4475–82.
151. Wang C, Yu G, Liu J, Wang J, Zhang Y, Zhang X, et al. Downregulation of PCDH9 predicts prognosis for patients with glioma. *J Clin Neurosci.* 2012;19(4):541–5.
152. Fernández V, Salamero O, Espinet B, Solé F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70(4):1408–18.

153. Zhu P, Lv J, Yang Z, Guo L, Zhang L, Li M, et al. Protocadherin 9 inhibits epithelial-mesenchymal transition and cell migration through activating GSK-3 β in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):567–74.
154. Xiao X, Zheng F, Chang H, Ma Y, Yao Y-G, Luo X-J, et al. The gene encoding protocadherin 9 (PCDH9), a novel risk factor for major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(5):1128–37.
155. TRAF7 [Internet]. The human protein atlas. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131653-TRAF7/tissue> (accessed on 18 March 2025)
156. Xu L-G, Li L-Y, Shu H-B. TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17278-82.
157. Yoshida H, Jono H, Kai H, Li J-D. The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 and TRAF7. *J Biol Chem*. 2005;280(49):41111-21.
158. Najm P, Zhao P, Steklov M, Sewduth RN, Baietti MF, Pandolfi S, et al. Loss-of-function mutations in TRAF7 and KLF4 cooperatively activate RAS-like GTPase signaling and promote meningioma development. *Cancer Res*. 2021;81(16):4218–29.
159. Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 2016;48(4):407–16.
160. Goode B, Joseph NM, Stevers M, Van Ziffle J, Onodera C, Talevich E, et al. Adenomatoid tumors of the male and female genital tract are defined by TRAF7 mutations that drive aberrant NF-kB pathway activation. *Mod Pathol*. 2018;31(4):660–73.
161. Klein CJ, Wu Y, Jentoft ME, Mer G, Spinner RJ, Dyck PJB, et al. Genomic analysis reveals frequent TRAF7 mutations in intraneural perineuriomas. *Ann Neurol*. 2017;81(2):316-21.
162. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2004;114(4):569–81.
163. Orock A, Zuccato JA, Phan K, Liu Y, Ihuoma J, Tavakol S, et al. TRAF7 in signaling and disease: emerging mechanisms and clinical implications. *Mol Med*. 2025;32(1):4.

164. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ.* 2008;86(8):650-2.
165. O'Rahilly R. Guide to the staging of human embryos. *Anat Anz.* 1972;130(5):556-9.
166. Mead R, Gilmour SG, Mead A. *Statistical Principles for the Design of Experiments: Applications to Real Experiments.* Cambridge: Cambridge University Press; 2012.
167. Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomol Detect Quantif.* 2014;1(1):23-33.
168. Gadkar V, Fillion M. New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr Issues Mol Biol.* 2014;16:1-6.
169. Feuer R, Vlaic S, Arlt J, Sawodny O, Dahmen U, Zanger UM, et al. LEMming: A Linear Error Model to Normalize Parallel Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Data as an Alternative to Reference Gene Based Methods. *PLoS One.* 2015;10(9):e0135852.
170. Cui X, Zhou J, Qiu J, Johnson MR, Mrug M. Validation of endogenous internal realtime PCR controls in renal tissues. *American journal of nephrology.* 2009;30(5):413-7.
171. Herath S, Dai H, Erlich J, Au AY, Taylor K, Succar L, et al. Selection and validation of reference genes for normalisation of gene expression in ischaemic and toxicological studies in kidney disease. *PLoS One.* 2020;15(5):e0233109.
172. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 2013;29(10):569-74.
173. Zhong C, Chen M, Chen Y, Yao F, Fang W. Loss of DSTYK activates Wnt³-catenin signaling and glycolysis in lung adenocarcinoma. *Cell death & disease.* 2021;12(12):1122.
174. Liu X, Lai C, Wang K, Xing L, Yang P, Duan Q, et al. A Functional Role of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) in the Suppression of Influenza A Virus Replication. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124651.
175. Dupasquier S, Delmarcelle A-S, Marbaix E, Cosyns J-P, Courtoy PJ, Pierreux CE. Validation of housekeeping gene and impact on normalized gene expression in clear cell Renal Cell Carcinoma: critical reassessment of YBX3/ZONAB/CSDA expression. *BMC Molecular Biology.* 2014;15(1):9.
176. Kwack M.H., Kim J.C., Kim M.K. Ectodysplasin-A2 induces apoptosis in cultured human hair follicle cells and promotes regression of hair follicles in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;520:428–433.

177. Bouchard M. Transcriptional control of kidney development. *Differentiation*. 2004;72:295–306.
178. Winyard P.J., Nauta J., Lirenman D.S., Hardman P., Sams V.R., Risdon R.A., Woolf A.S. Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int*. 1996;49:135–146.
179. Cai Z., Deng X., Jia J., Wang D., Yuan G. Ectodysplasin A/Ectodysplasin A Receptor System and Their Roles in Multiple Diseases. *Front. Physiol*. 2021;12:788411.
180. Evans D. Urogenital system organs. In: Stevenson R., editor. *Human Malformations and Related Anomalies*. 2nd ed. Oxford University Press; Oxford, NY, USA: 2005. p. 1161e250.
181. Pieczynski J., Margolis B., Koehler S., Tellkamp F., Niessen C.M., Bloch W., Kerjaschki D., Schermer B., Benzing T., Brinkkoetter P.T., et al. Protein complexes that control renal epithelial polarity. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol*. 2011;300:F589–F601.
182. Schlüter M.A., Margolis B. Apical Lumen Formation in Renal Epithelia. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009;20:1444–1452.
183. Boutet A., De Frutos C.A., Maxwell P.H., Mayol M.J., Romero J., Nieto M.A. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J*. 2006;25:5603–5613.
184. Tissue Expression of TRAF7—Staining in Kidney—The Human Protein Atlas [Internet]. *Proteinatlas.org*. [(accessed on 9 April 2026)]. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131653-TRAF7/tissue/kidney>
185. Tsitsikov E.N., Phan K.P., Liu Y., Tsytsykova A.V., Kinter M., Selland L., Garman L., Griffin C., Dunn I.F. TRAF7 is an essential regulator of blood vessel integrity during mouse embryonic and neonatal development. *iScience*. 2023;26:107474.
186. Ribatti D., Ligresti G., Nicosia R.F. Kidney endothelial cell heterogeneity, angiocrine activity and paracrine regulatory mechanisms. *Vasc. Pharmacol*. 2023;148:107139.
187. Daniel E., Azizoglu D.B., Ryan A.R., Walji T.A., Chaney C.P., Sutton G.I., Carroll T.J., Marciano D.K., Cleaver O. Spatiotemporal heterogeneity and patterning of developing renal blood vessels. *Angiogenesis*. 2018;21:617–634.
188. Abrahamson D.R. Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. *Organogenesis*. 2009;5:1–13.

189. Mishra-Gorur K., Barak T., Kaulen L.D., Henegariu O., Jin S.C., Aguilera S.M., Yalbir E., Goles G., Nishimura S., Miyagishima D., et al. Pleiotropic role of TRAF7 in skull-base meningiomas and congenital heart disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2023;120:e2214997120.
190. Bai Y., Wei C., Li P., Sun X., Cai G., Chen X., Hong Q. Primary cilium in kidney development, function and disease. *Front. Endocrinol*. 2022;13:952055.
191. Santoni M., Piva F., Cimadamore A., Giulietti M., Battelli N., Montironi R., Cosmai L., Porta C. Exploring the Spectrum of Kidney Ciliopathies. *Diagnostics*. 2020;10:1099.
192. McConnachie D.J., Stow J.L., Mallett A.J. Ciliopathies and the Kidney: A Review. *Am. J. Kidney Dis*. 2021;77:410–419.
193. Bouwmeester T., Bauch A., Ruffner H., Angrand P.-O., Bergamini G., Croughton K., Cruciat C., Eberhard D., Gagneur J., Ghidelli S., et al. A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol*. 2004;6:97–105.
194. Clancy B., Darlington R.B., Finlay B.L. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. 2001;105:7–17.
195. Lindström N.O., McMahon J.A., Guo J., Tran T., Guo Q., Rutledge E., Parvez R.K., Saribekyan G., Schuler R.E., Liao C., et al. Conserved and divergent features of human and mouse kidney organogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2018;29:785–805.
196. Kelam J., Kelam N., Filipović N., Komić L., Racetin A., Komić D., Kostić S., Kuzmić Prusac I., Vukojević K. Expression of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) candidate genes EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in normal human kidney development and CAKUT. *Genes*. 2024;15:702.
197. Kelam N., Racetin A., Katsuyama Y., Vukojević K., Kostić S. Immunohistochemical expression pattern of FGFR1, FGFR2, RIP5, and HIP2 in developing and postnatal kidneys of *Dab1*^{-/-} (yotari) mice. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23:2025.
198. Maglica M., Kelam N., Haque E., Perutina I., Racetin A., Filipović N., Katsuyama Y., Vukojević K. Immunoexpression pattern of autophagy markers in developing and postnatal kidneys of *Dab1*^{-/-} (yotari) mice. *Biomolecules*. 2023;13:402.
199. Pisan E., De Luca C., Brancati F., Sanchez Russo R., Li D., Bhoj E., Wenger T., Marwaha A., Johnson N., Beneteau C., et al. The spectrum of heart defects in the TRAF7-related

- multiple congenital anomalies-intellectual disability syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2024;121:e2317601121.
200. Mohamed T., Sequeira-Lopez M.L.S. Development of the renal vasculature. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019;91:132–146.
201. Munro D.A.D., Hohenstein P., Davies J.A. Cycles of vascular plexus formation within the nephrogenic zone of the developing mouse kidney. *Sci. Rep.* 2017;7:3273.
202. Bock H.H., May P. Canonical and non-canonical Reelin signaling. *Front. Cell Neurosci.* 2016;10:166.
203. Scott E., Dougherty T.J., Gorski G., Hatcher C.J. Reelin signaling in vascular endothelial cell biology. *FASEB J.* 2019;33:83–84.
204. Racetin A., Filipovic N., Lozic M., Ogata M., Gudelj Ensor L., Kelam N., Kovacevic P., Watanabe K., Katsuyama Y., Saraga-Babic M., et al. A Homozygous *Dab1*^{−/−} Is a Potential Novel Cause of Autosomal Recessive Congenital Anomalies of the Mice Kidney and Urinary Tract. *Biomolecules*. 2021;11:609.
205. Sweetwyne M.T., Tao J., Susztak K. Kick it up a notch: Notch signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int. Suppl.* 2014;4:91–96.

12. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Jelena Komić

Datum i mjesto rođenja: 1.12.1996., Split

Elektronička pošta: jelena.kelam@dz-sdz.hr

Državljanstvo: hrvatsko

OBRAZOVANJE

2023. – danas Poslijediplomski doktorski studij Biologija novotvorina, Medicinski fakultet
Sveučilišta u Splitu

2016. – 2022. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2012. – 2016. Opća gimnazija Srednja škola “Braća Radić”, Kaštel Novi

2004. – 2012. Osnovna škola prof. Filipa Lukasa, Kaštel Stari

RADNO ISKUSTVO

prosinac 2022. – danas Specijalizant obiteljske medicine, Dom zdravlja Splitsko –
dalmatinske županije

listopad 2022. – prosinac 2022. Liječnik, Specijalistička ordinacija obiteljske medicine Marija
Klarić, dr.med., Trogir

MATERINSKI JEZIK

Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

Engleski jezik

PUBLIKACIJE I SAŽECI SA SKUPOVA

- Smoljo L, Mateljak T, Racetin A, Todorović P, **Komić J**, Komić L, et al. Epithelial–mesenchymal transition markers in clear cell renal cell carcinoma: Expression patterns and prognostic significance. J Pers Med. 2026;16(6):279.
- Komić L, **Komić J**, Pavlović N, Kumrić M, Bukić J, Jerončić Tomić I, et al. The adipokine axis in heart failure: Linking obesity, sarcopenia and cardiac dysfunction in HFpEF. Int J Mol Sci. 2026;27(2):612.

- **Komić J**, Kelam N, Racetin A, Filipović N, Saraga-Babić M, Ihara D, et al. Spatial and temporal expression patterns of EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in yotari (*Dab1*^{-/-}) mice: Implications for understanding CAKUT pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2025;26(13).
- Komic L, Kumric M, **Komic J**, Tomicic M, Kurir TT, Grahovac M, et al. The hidden price of plenty: Oxidative stress and calorie-induced cardiometabolic dysfunction. *Life (Basel).* 2025;15(7).
- **Kelam J**, Kelam N, Filipović N, Komić L, Racetin A, Komić D, et al. Expression of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) candidate genes EDA2R, PCDH9, and TRAF7 in normal human kidney development and CAKUT. *Genes (Basel).* 2024;15(6):702.
- Komic L, Kumric M, Urlic H, Rizikalo A, Grahovac M, **Kelam J**, et al. Obesity and clonal hematopoiesis of indeterminate potential: Allies in cardiovascular diseases and malignancies. *Life (Basel).* 2023;13(6).