SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

NIKOLA PAVLOVIĆ

ITGA8 I VANGL2 KAO PROGNOSTIČKI MARKERI UROĐENIH ANOMALIJA BUBREGA I MOKRAĆNOG TRAKTA U ČOVJEKA I MIŠA

DOKTORSKI RAD

SPLIT, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

NIKOLA PAVLOVIĆ

ITGA8 I VANGL2 KAO PROGNOSTIČKI MARKERI UROĐENIH ANOMALIJA BUBREGA I MOKRAĆNOG TRAKTA U ČOVJEKA I MIŠA

DOKTORSKI RAD

MENTOR:
prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

SPLIT, 2025.

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka, Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: “Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava” (NEPHROGEN IP-2022-10-8720) voditeljice prof. dr. sc. Katarine Vukojević, dr. med.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med.

Objavljeni znanstveni rad na kojemu se temelji doktorski rad:

Pavlović N, Kelam N, Racetin A, Filipović N, Pogorelić Z, Kuzmić Prusac I, Vukojević K. Expression Profiles of ITGA8 and VANGL2 are Altered in Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT). *Molecules* 2024;29, 3294. (čimbenik odjeka 4.2)

Najveća hvala mentorici prof. dr. sc. Katarini Vukojević, dr. med., na prilici da istražujem i učim u njezinom laboratoriju, kao i na svim mogućnostima koje mi je pružila i otvorila.

Hvala svim kolegama iz Laboratorija za istraživanje ranog razvoja čovjeka na svoj pomoći i savjetima, a posebice dr. sc. Neli Kelam i dr. sc. Aniti Racetin.

Hvala kolegama s Mediteranskog instituta za istraživanje života, a osobito dr. sc. Jeleni Budimir na nesebičnom dijeljenju znanja i laboratorijskih vještina.

Puno hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i motivaciji.

Ovaj doktorski rad je posveta mojim roditeljima Mirjani i Ivanu, čija su ljubav i žrtva utkane u svaki uspjeh koji sam postigao. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA.....1

1. UVOD.....5

1.1. Urođene anomalije bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT).....6

1.2. Etiologija i patogeneza CAKUT-a.....7

1.3. Klasifikacija CAKUT-a.....8

1.3.1. Renalna hipoplazija.....9

1.3.2. Renalna displazija.....11

1.3.3. Potkovasti bubreg.....12

1.4. *Yotari* (*Dab1-/-*) miš.....13

1.5. Morfogeneza bubrega u čovjeka i miša.....15

1.6. Geni uključeni u razvoj bubrega.....18

1.7. ITGA8 u razvoju bubrega i mokraćnog trakta.....20

1.8. VANGL2 u razvoju bubrega i mokraćnog trakta.....21

2. HIPOTEZA I CILJEVI.....23

2.1. Hipoteza istraživanja.....24

2.2. Ciljevi istraživanja.....24

3. MATERIJALI I METODE.....25

3.1. Etička načela.....26

3.2. Ljudsko fetalno bubrežno tkivo.....26

3.3. Životinjsko embrionalno i postnatalno bubrežno tkivo.....28

3.4. Određivanje veličine uzorka.....,.....29

3.5. Bojenje hematoksilinom i eozinom (H&E).....29
3.6. Imunofluorescencija na postmortalnom ljudskom prenatalnom bubrežnom tkivu…..30
3.7. Prikupljanje podataka i analiza slika.....31
3.8. Statistička analiza.....32
3.9. Validacija izražaja gena ITGA8 i VANGL2 iz javno dostupnih baza podataka.....32
4. REZULTATI.....34
4.1. Histološka analiza normalnog, zdravog fetalnog bubrega (CTRL) i različitih fenotipova fetalnih bubrega zahvaćenih urođenim anomalijama bubrega (CAKUT).....35
4.2. Izražaj proteina ITGA8 u normalnim, zdravim bubrezima tijekom fetalnog razvoja...36
4.3. Izražaj proteina ITGA8 u različitim CAKUT fenotipovima.....38
4.4. Izražaj proteina VANGL2 u normalnim, zdravim bubrezima tijekom fetalnog razvoja.....40
4.5. Izražaj proteina VANGL2 u različitim CAKUT fenotipovima.....42
4.6. Izražaj proteina Itga8 u embrionalnim i postnatalnim uzorcima bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*).....44
4.7. Izražaj proteina Vangl2 u embrionalnim i postnatalnim uzorcima bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*).....48
4.8. Izražaj gena *ITGA8* i *VANGL2* iz GSE83946 i GSE85976 baza podataka.....52
5. RASPRAVA.....54
5.1. Izražaj proteina ITGA8 i VANGL2 u zdravim, normalnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim urođenim anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT).....55

5.2. Izražaj proteina Itga8 i Vangl2 u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) miševa.....57

6. ZAKLJUČCI.....59

7. LITERATURA.....62

8. SAŽETAK.....65

9. SUMMARY.....68

10. ŽIVOTOPIS.....83

POPIS OZNAKA I KRATICA

A/Cd – ampula/sabirni kanalić (engl. *ampulla/collecting duct*)

AC – apikalna kontrakcija (engl. *apical constriction*)

ANOVA – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

Akt – Ser/Thr - kinaza B

ApoEr2 – apolipoprotein receptor 2 (engl. *Apolipoprotein E receptor 2*)

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

CE – konvergentno produljenje (engl. *convergent extension*)

Crk – protoonkogen

Ct – zavijeni kanalić (engl. *convoluted tubule*)

CKD – kronična bolest bubrega (engl. *chronic kidney disease*)

CTRL – normalni, zdravi bubreg (engl. *control kidneys*)

C3G – čimbenik zamjene gvanina (engl. *Guanine nucleotide exchange factor*)

DAPI – 4′,6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4′,6-diamidino-2-phenylindole*)

DCT – distalni zavijeni kanalić (engl. *distal convoluted tubule*)

DK – bubrezi s udvostručenim ureterom (engl. *duplex kidneys*)

dw – razvojni tjedan (engl. *developmental week*)

DYS – displastični bubrezi (engl. *dysplastic kidneys*)

E – embrionalni razvoja

Fgf7 – fibroblastni čimbenik rasta 7 (engl. *Fibroblast growth factor 7*)

Foxd1 – Forkhead box D1

G – glomerul (engl. *glomerulus*)

g – nezreli glomerul (engl. *immature glomeruli*)

Gpc3 – glipikan 3 (engl. *Glypican 3*)

Gdnf – neurotrofni čimbenik glije (engl. *Glial derived neurotrophic factor*)

HC – zdrave kontrole (engl. *healthy controls*)

Hox – geni Homeobox

HYP – hipoplastični bubrezi (engl. *hypoplastic kidneys*)

IM – intermedijarni mezoderm (engl. *intermediate mesoderm*)

ITGA8 – Integrin alfa-8 (engl. *Integrin subunit alpha 8*)

KBC – klinički bolnički centar

MM – metanefrički mezenhim (engl. *metanephric mesenchyme*)

mTOR – cilj rapamicina kod sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)

mm – metanefrogeni mezenhim (engl. *metanephric mesenchyme*)

NGS – sekvenciranja nove generacije (engl. *next generation sequencing*)

P – postnatalni razvoj

Pax2 – upareni gen 2 (engl. *paired box gene 2*)

PBS – fiziološka otopina puferirana fosfatom (engl. *phosphate-buffered saline*)

PCR - polimerazna lančana reakcija (engl. *polymerase chain reaction*)

PCT – proksimalni zavijeni kanalić (engl. *proximal convoluted tubule*)

PFA – paraformaldehid (engl. *paraformaldehyde*)

PI3K – fosfatidil inozitol 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinases*)

PUV – opstrukcija stražnjih uretralnih zalistaka (engl. *posterior urethral valves*)

Rara – retinoički receptor alfa (engl. *Retinoic acid receptor alpha*)

Rap1 – protein 1 vezan uz RAS

Ret – Ret protoonkogen (engl. *Ret proto-oncogene*)

rv – bubrežni mjehurić (engl. *renal vesicle*)

SD – standardna devijacija

SMAD – Sma i Mad protein (engl. *Sma and Mad protein*)

UB – bubrežni pupoljak (engl. *ureteric bud*)

UPJO – opstrukcija ureteropelvičnog spoja (engl. *ureteropelvic junction obstruction*)

UVJO – opstrukcija između uretera i mokraćnog mjehura (engl. *ureterovesical junction obstruction*)

VANGL2 – VANGL protein planarne polarnosti stanice 2 (engl. *Van Gogh-like Planar Cell Polarity Protein 2*)

VLDLR - lipoproteinski receptor jako niske gustoće (engl. *very low-density lipoprotein receptor*)

VUR – vezikoureteralni refluks (engl. *vesicoureteric reflux*)

Wnt1 – Wnt obitelj 11 (engl. *Wnt family member 1*)

Wnt6 – Wnt obitelj 6 (engl. *Wnt family member 6*)

Wnt11 – Wnt obitelj 11 (engl. *Wnt family member 11*)

WT1 – Wilmsov tumorski protein 1 (engl. *Wilms tumor 1*)

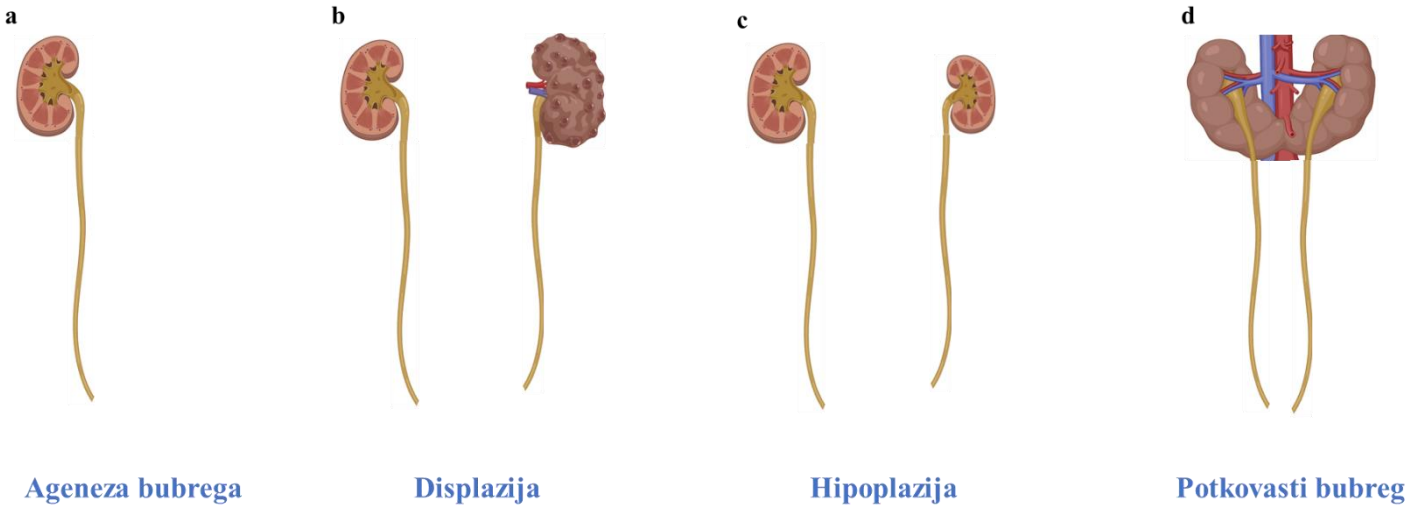
1. UVOD

1.1. Urođene anomalije bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT)

Urođene anomalije bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT) uzrokovane su poremećajima u razvoju bubrega i mokraćnog trakta, a sa srčanim manama, spadaju među najčešće urođene malformacije u svijetu i predstavljaju glavni uzrok zatajenja bubrega u djece (1–6). Osobe pogođene CAKUT-om imaju širok spektar malformacija, a koje se mogu pojaviti samostalno ili kao dio sindromskih stanja (7–12).

CAKUT malformacije izvorno je opisala doktorica Edith Potter, koja je proučavala nekropsije fetusa i beba kako bi razumjela njihov normalan i abnormalan razvoj (3). Malformacije se makroskopski očituju kao promjene u veličini, obliku, položaju ili broju bubrega, dok se mikroskopski očituju smanjenim brojem nefrona i/ili abnormalnom histologijom (13, 14).

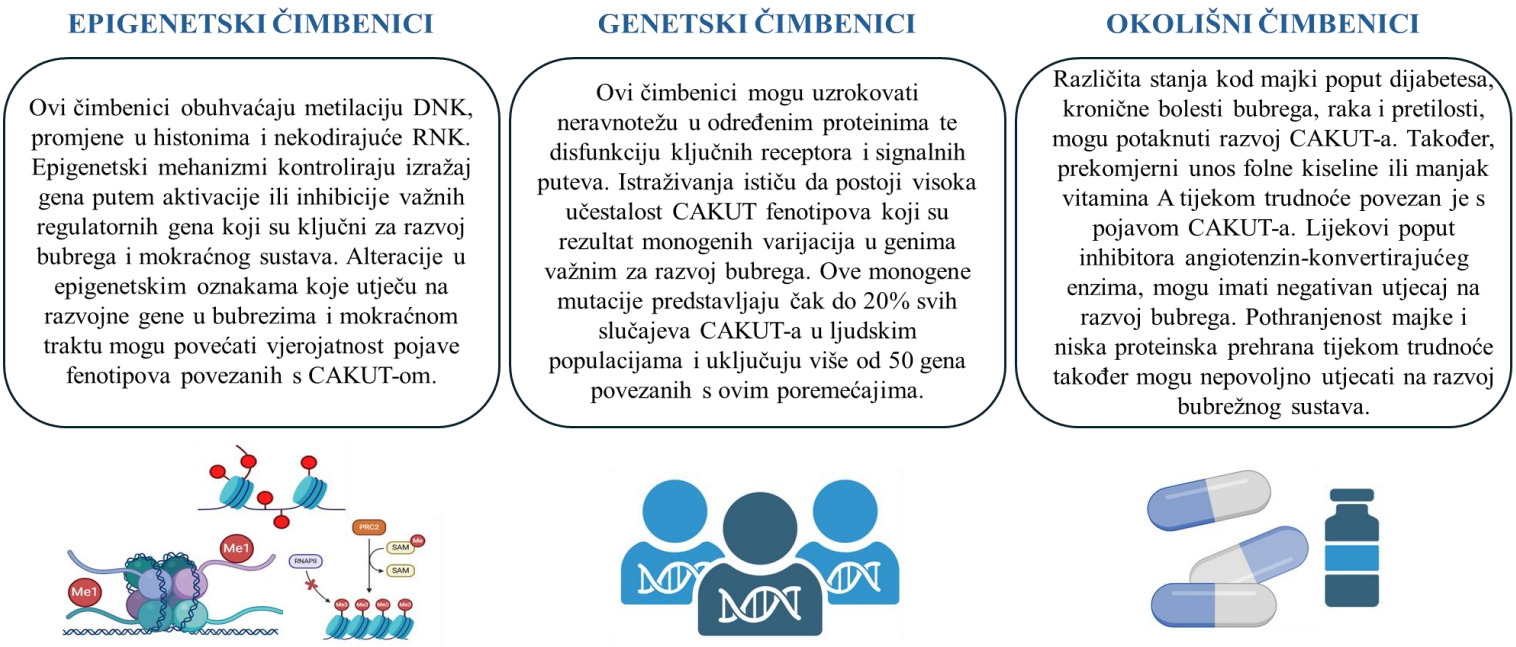
Cistična bubrežna displazija je jedna od najčešćih malformacija povezanih s CAKUT-om, dok ostali fenotipovi uključuju agenezu bubrega, hipoplaziju bubrega, potkovasti bubreg, vezikoureteralni refluks (VUR), megaureter, ektopični ureter i dvostruki ureter (15–17) (**Slika 1**).



Slika 1. Anomalije bubrega ilustrirane su i označene slovima od **a-d**. CAKUT fenotipski spektar uključuje anomalije bubrega, mokraćovoda i donjeg urinarnog trakta. Slika prikazuje najčešće anomalije bubrega: ageneza bubrega (**a**), displazija (**b**), hipoplazija (**c**) i potkovasti bubreg (**d**). Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

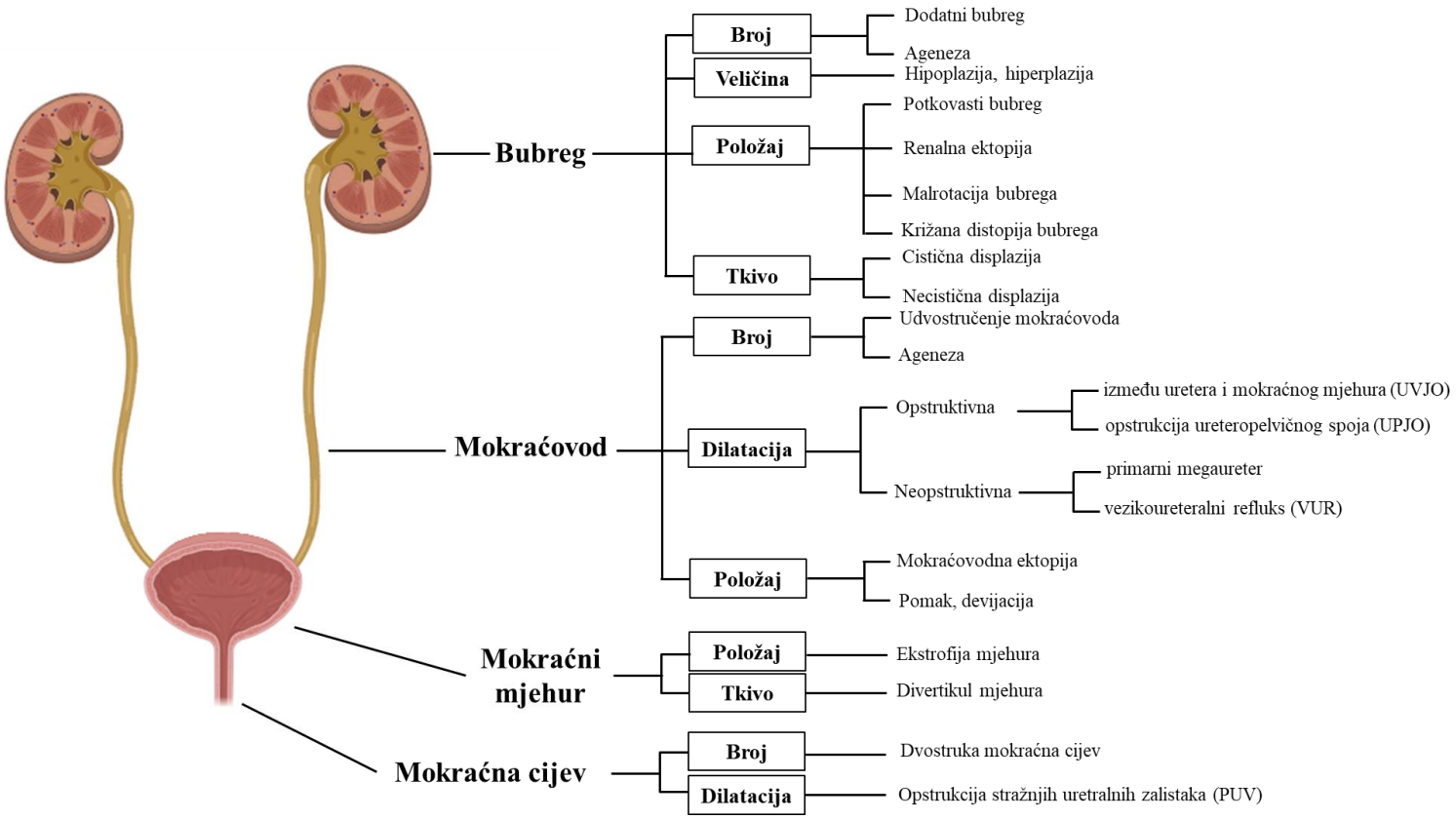
1.2. Etiologija i patogeneza CAKUT-a

Etiologija i patogeneza CAKUT-a za većinu slučajeva ostaje nejasna, te se pretpostavlja da se radi o složenom poremećaju, koji uključuje okolišne čimbenike i genetsko podrijetlo. Ichikawa i suradnici (18) su tvrdili da bi malformacije CAKUT-a mogle imati zajedničko monogeno podrijetlo, a do danas su identificirane mutacije u otprilike 54 gena kao monogeni uzroci CAKUT-a. Uz pomoć tehnologije sekvenciranja nove generacije (NGS), identificirano je 45 monogenih uzroka nesindromskog CAKUT-a i više od 150 monogenih uzroka sindromskog CAKUT-a. Osim molekularnih poremećaja koji se javljaju tijekom embrionalnog razvoja, CAKUT može biti rezultat različitih epigenetskih, genetskih i okolišnih čimbenika (19, 20) (**Slika 2**).



Slika 2. Čimbenici povezani s urođenim anomalijama bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT-om). Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

1.3. Klasifikacija CAKUT-a



Slika 3. Prikaz fenotipova urođenih anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT). Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

1.3.1. Renalna hipoplazija

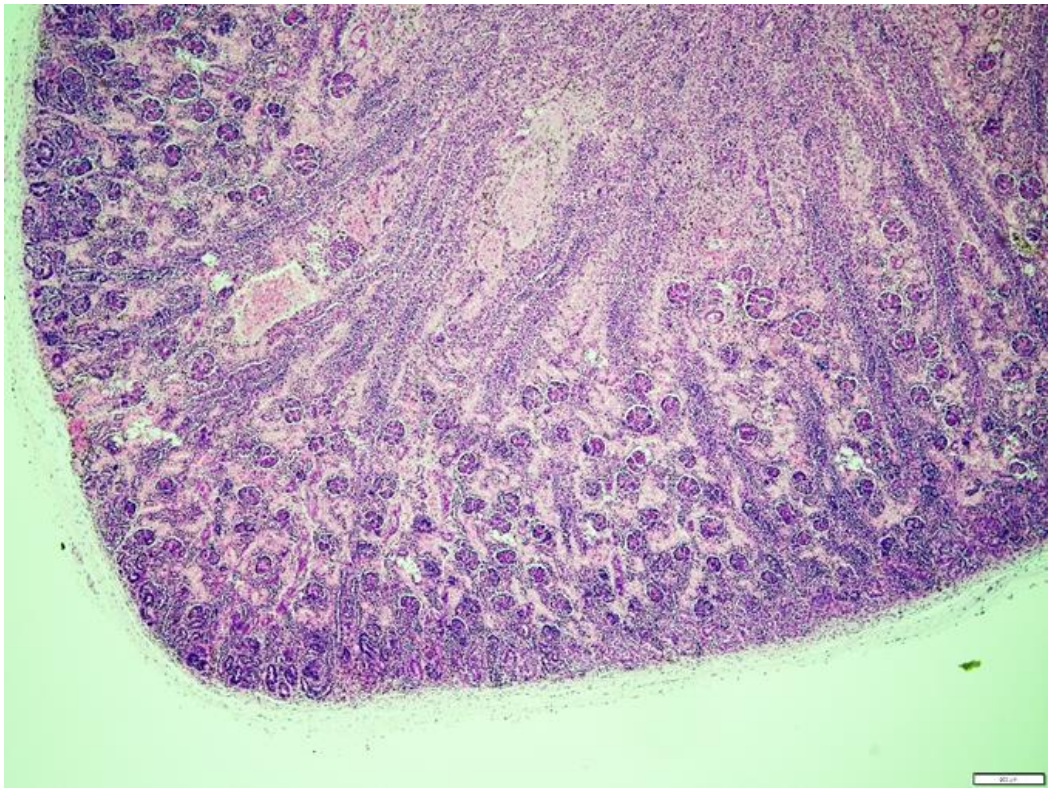
Renalna hipoplazija je urođena anomalija bubrega koja se tradicionalno definira kao značajno smanjenje bubrežne mase, a najčešće se javlja u djetinjstvu. Postoje četiri prepoznate vrste ove bolesti: segmentalna (Ask-Upmark bubreg), oligomeganefronska, jednostavna (21, 22) i kortikalna hipoplazija (23–26), pri čemu sve vrste imaju zajedničku karakteristiku smanjenog broja bubrežnih režnjeva (27, 28).

Segmentalna hipoplazija, koju je prvi opisao Ask-Upmark u publikaciji iz 1929. godine, obično se dijagnosticira u djece s hipertenzijom ili infekcijama mokraćnog sustava (27, 29–31). Ovaj tip hipoplazije se češće javlja kod žena (72%) i može zahvatiti jedan (unilateralna) ili oba bubrega (bilateralna), a povezana je s reninom posredovanom hipertenzijom (32–35). Bubreg kod segmentalne hipoplazije je smanjen, s karakterističnim poprečnim utorima na površini iznad proširenih čašica, dok presjek pokazuje tanki sloj parenhima koji ukazuje na neuspjeli razvoj bubrežnih režnjeva (25, 30, 36, 37).

Oligomeganefronska hipoplazija, koju su prvi opisali Röyer i suradnici u publikaciji iz 1962. godine, karakterizira se smanjenim brojem nefrona koji su značajno uvećani, a bolest je povezana sa smanjenom veličinom bubrega i smanjenom glomerularnom filtracijom (38–41). Histološki gledano, u ranijim stadijima bolest dolazi do znatnog povećanja svih dijelova nefrona, uključujući glomerule, jukstaglomerularni aparat i tubule (42, 43). Dijagnoza ove vrste hipoplazije može biti otežana zbog nedostatka podataka o veličini bubrega i broju režnjeva (42).

Jednostavna hipoplazija, koju su prvi opisali Rubenstein i suradnici u publikaciji iz 1961. godine, označava stanje u kojem bubrezi imaju smanjenu veličinu, pri čemu je njihova težina 50% ili manje od očekivane, a kod bilateralne hipoplazije ukupna težina oba bubrega iznosi manje od 33% predviđene (44–46). Klinički gledano, jednostavna hipoplazija često je povezana s hipertenzijom, a ako je bilateralna, može uzrokovati progresivno smanjenje bubrežne funkcije. Kod jednostrane hipoplazije, često dolazi do kompenzacijske hipertrofije suprotnog bubrega, uz očuvanu funkciju. Za razliku od oligomeganefronske hipoplazije, koju karakterizira povećanje svih dijelova nefrona, histološki pregled jednostavne hipoplazije potvrđuje normalnu strukturu nefrona, dok su ciste i displazija odsutni (21, 47–49).

Kortikalna hipoplazija, prvi put je opisana kod pasa, 1957. godine, u ljudi je karakterizirana smanjenim brojem generacija nefrona kao posljedicu prekida ili zaustavljanja nefronegeneze, što rezultira manjom ukupnom veličinom bubrega (49, 50). Hinchcliffe i suradnici kategorizirali su kortikalnu hipoplaziju na temelju radijalnog broja glomerula: normalna (>10), minimalna (8–10), umjerena (4–8) i teška (<4) (51).



Slika 4. Mikroskopska snimka hipoplastičnog bubrega pokazuje normalnu kortiko-medularnu strukturu, ali je bubreg manji, s manjim brojem nefrona i bubrežnih vrčeva u usporedbi s normalnim bubregom. Kora bubrega je tanja, a migracija glomerula prema unutarnjoj zoni bubrežne kore je oslabljena. Nisu prisutne ciste, atrofični kanalići ili druga displastična obilježja. Fotografija je snimljena s 4x povećanjem na preparatu ljudskog bubrega iz 30. tjedna fetalnog razvoja. Autor: Nikola Pavlović

Tablica 1. Kriteriji dijagnoze renalne hipoplazije.

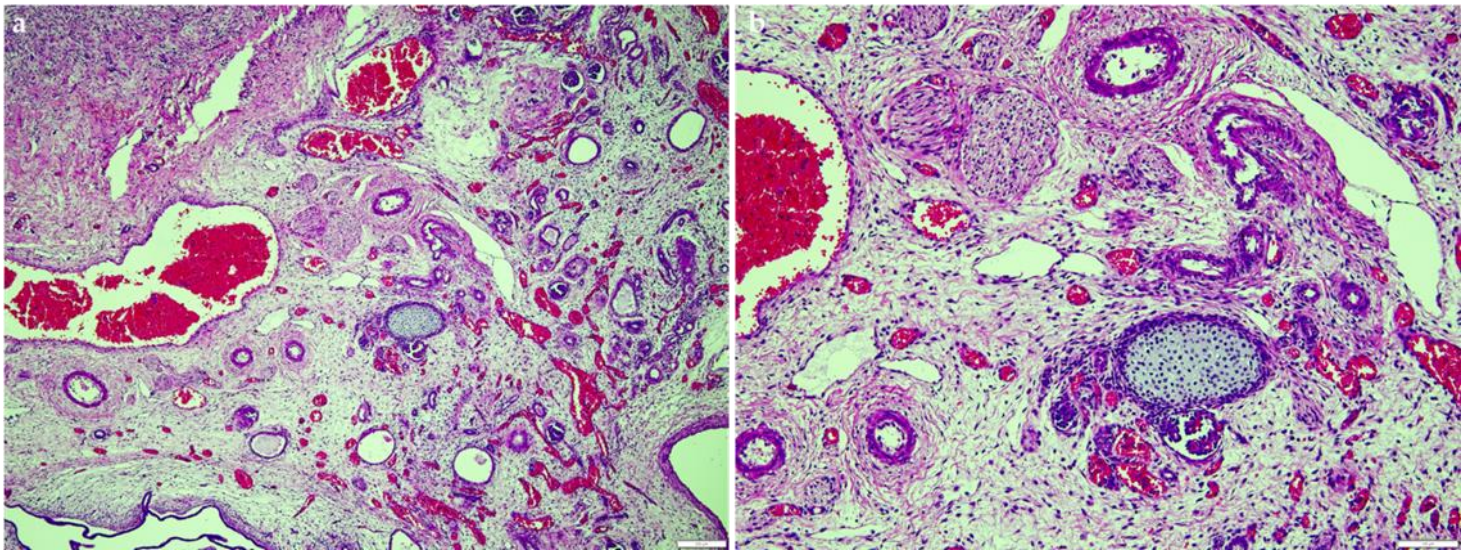
Vrsta hipoplazije	Kriteriji dijagnoze
Segmentalna hipoplazija	Poprečni utori kore prekrivaju proširene čašice. Kora – nedostatak glomerula, kako normalnih, tako i atrofičnih. Medula – odsutna ili rudimentarna, uz prisutnost medularne displazije.
Oligomeganefronija	Obostrano zahvaćenje, osim ako nije povezano s jednostranom agenezom. Smanjen broj bubrežnih režnjeva, ispod 5-6. Nefroni su morfološki normalni, ali značajno uvećani.
Jednostavna hipoplazija	Jedan bubreg manji od 50% normalne veličine ili oba bubrega manja od 30% normalne veličine. Histološki normalni, nefroni nisu uvećani.
Kortikalna hipoplazija	Broj radijalnih glomerula manji ili jednak 8.

1.3.2. Renalna displazija

Renalna displazija je urođena anomalija koja se klasično se opisuje kao razvojni poremećaj pri kojem se bubrezi ne diferenciraju normalno, što rezultira prisutnošću primitivnih tubula, intersticijske fibroze, bubrežnih cista i hrskavice unutar bubrežnog parenhima (18, 52, 53). S druge strane, renalna hipoplazija odnosi se na nenormalno male bubrege s normalnom morfologijom, ali smanjenim brojem nefrona. Ultrazvučno mjerenje veličine bubrega trenutno se koristi za procjenu ozbiljnosti renalne hipoplazije i displazije, ali ima ograničenja poput nemogućnosti razlikovanja hipoplazije i displazije. Mutacije u genima koji su povezani s razvojem bubrega, poput *GLI3*, *PAX2*, *SALL1*, *HPSE2*, *EYA1*, *FGF20*, *MIR17HG* i *MYCN* (54–65).

Cistična renalna displazija, razvojni poremećaj koji se očituje prisutnošću jedne ili više cisti, smanjenom veličinom bubrega i odsutnošću kortiko-medularne diferencijacije. Ovaj poremećaj je vrlo rijedak s učestalošću od 0,2-0,5%. Iako cistična renalna displazija može nastati neovisno, često je povezana s genetskim poremećajima poput aplazije Mullerovog kanala, sindroma renalnog koloboma (mutacija gena *PAX2*), srčanim manama te drugim razvojnim abnormalnostima poput CHARGE i BOR sindroma (66–68). Iako cistična bubrežna displazija može biti jednostrana ili obostrana, jednostrana je češća. Obostrana displazija gotovo uvijek vodi do smrti novorođenčeta, dok slučajevi jednostrane displazije mogu imati dobru prognozu nakon

kirurškog uklanjanja zahvaćenog bubrega, budući da funkcija drugog bubrega ostaje očuvana. (18, 53).



Slika 5. Mikroskopske snimke displastičnog bubrega. Fotografije su snimljene s 4x (**a**) i 40x (**b**) povećanjem na preparatu ljudskog bubrega iz 35. tjedna fetalnog razvoja. Autor: Nikola Pavlović

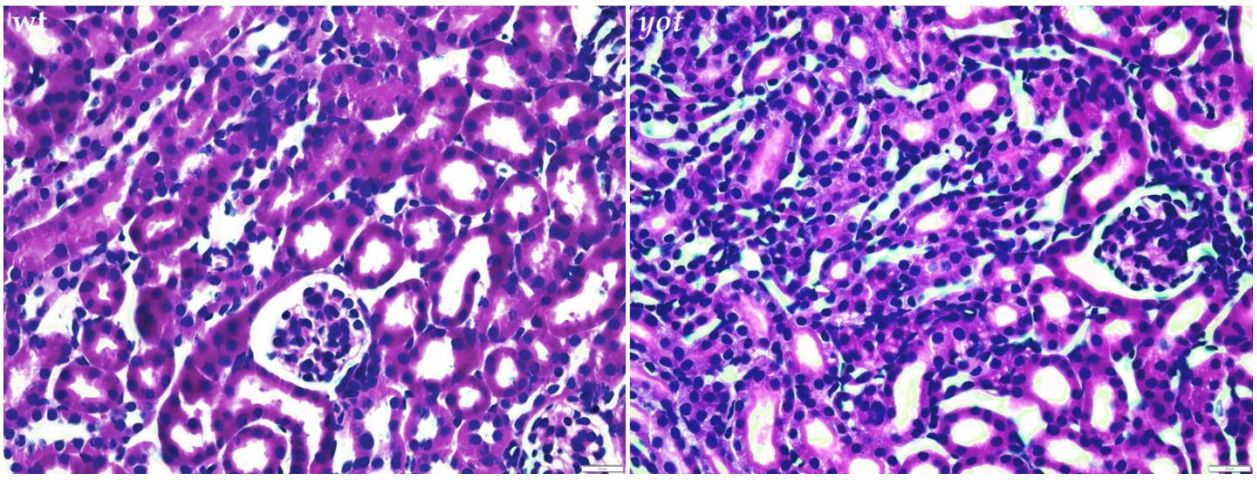
1.3.3. Potkovasti bubreg

Potkovasti bubreg, najčešća je anomalija srastanja bubrega, prvi put je opisana tijekom autopsija koje je 1522. godine proveo da Carpi, a prisutna je u oko 0,25% populacije. Ova anomalija karakterizirana je abnormalnostima u položaju, rotaciji i vaskularnoj opskrbi bubrega, pri čemu su bubrežne mase povezane istmusom, najčešće sastavljenim od bubrežnog parenhima i spojenim na donjem polu bubrega u više od 90% slučajeva. Pacijenti s potkovastim bubrezima imaju povećan rizik od VUR-a, bubrežnih kamenaca, UPJO-a, infekcija mokraćnog sustava te malignih tumora bubrega. Većina slučajeva otkriva se slučajno tijekom ispitivanja zbog drugih medicinskih problema, obično pomoću ultrazvuka (69–75).

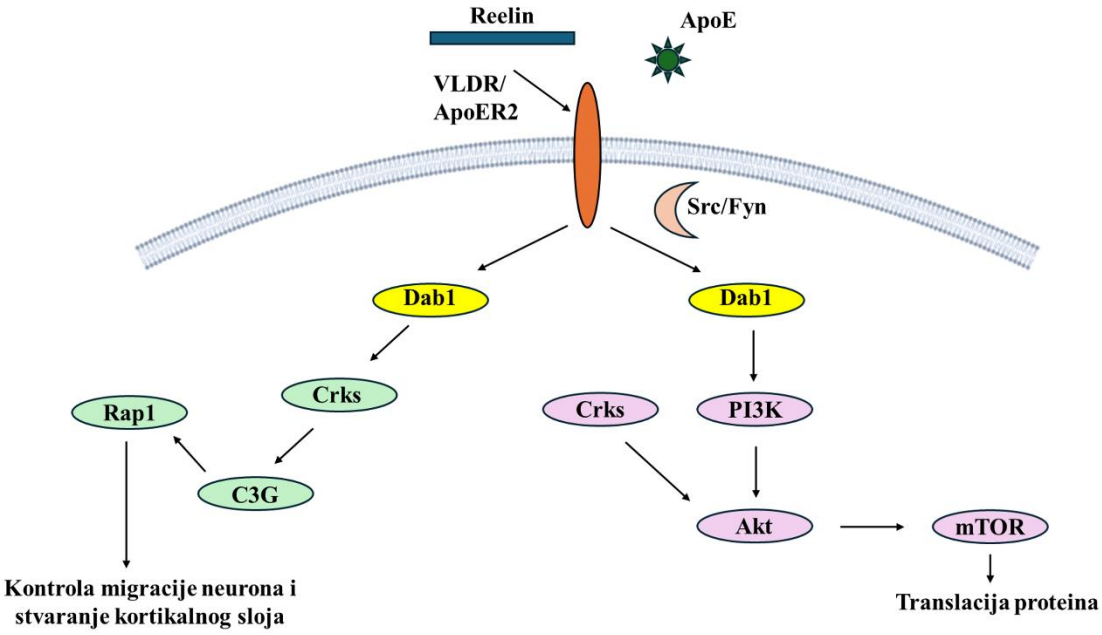
1.4. *Yotari (Dab1-/-)* miš

Yotari (*yot*) miš je laboratorijska životinja s genetski modificiranom mutacijom u genu *Dab1* (*Disabled-1*) (76). Gen *Dab1* dio je Reelin signalnog puta (**Slika 4**), koji je važan za migraciju i smještanje neuronskih stanica tijekom razvoja mozga. Stoga, mutacija u genu *Dab1* rezultira abnormalnim razvojem mozga i pojavom neuroloških disfunkcija u miševa (76). Osim toga, signalni put Reelin-Dab1 važan je i za razvoj skeletnog sustava te interakcije između različitih signalnih mehanizama tijekom embrionalnog razvoja (77, 78).

Izražaj proteina DAB1 nedavno je potvrđen u podocitima miša (79) i ljudskom fetalnom bubregu (80), gdje djeluje kao adapter molekula u procesu unutarstanične transdukcije Reelin signala (81, 82). Najnovija istraživanja su u *yotari* miševa otkrila prisutnost CAKUT fenotipa, koji se očituje kroz bubrežnu hipoplaziju, nepravilno poravnanje nožica podocita u glomerulima bubrega te gubitak funkcionalnog bubrežnog tkiva (83). Ovi podatci upućuju na to da kronična bubrežna bolest (CKD) može biti uzrok preuranjene smrti *yotari* miševa, a da njezin nastanak može biti povezan s različitim mehanizmima koji utječu na strukture bubrega (83, 84).



Slika 6. Hematoksilin i eozin (H&E) bojenje postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*). Mjerna trakica iznosi 20 µm, a povećanje 40x. Autor: Nikola Pavlović



Slika 7. Shematski prikaz Reelin signalnih mehanizama. Izvanstanični Reelin se povezuje s receptorima VLDR i ApoER2, što dovodi do aktivacije Src/Fyn kinaza, koje potom fosforiliraju unutarstanični protein Dab1. U prenatalnom razdoblju, Reelin upravlja migracijom neurona i organizacijom kortikalnih slojeva preko Crks/C3G/Rap1 signalnog mehanizma. Tijekom ranog postnatalnog razvoja središnjeg živčanog sustava, adaptorski proteini i PI3K/Akt/mTOR signalni put potiču sintezu proteina, što pospješuje razvoj dendrita. Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

1.5. Morfogeneza bubrega u čovjeka i miša

Bubreg je parni organ koji se u viših kralježnjaka razvija iz intermedijarnog mezoderma (IM), u tri stadija: pronefros (predbubreg), mesonefros (prabubreg) i metanefros (definitivan bubreg) (85–87). Pronefros, najjednostavniji stadij bubrega u viših kralježnjaka, razvija se kao rudimentarni organ, dok je prvi funkcionalni bubreg u embriju mezonefros, koji kasnije biva zamijenjen metanefrosom, definitivnim bubregom odraslih jedinki, a svi ovi oblici bubrega evoluirali su postupno tijekom evolucije (88).

Morfogeneza bubrega u čovjeka i miša slijedi sličan obrazac, no postoji razlika u vremenskim okvirima za pojavu i regresiju prijelaznih stadija bubrega, što proizlazi iz razlike u trajanju trudnoće, koja je kod ljudi prosječno 40 tjedana, a kod miševa 20 dana (89).

Predbubreg (grč. *pronefros* – prije bubrega), označava najprimitivniji oblik bubrega (90). Prabubreg se formira iz mezodermalnih stanica koje nazivamo nefrotomi, smještenih u vratnom dijelu nefrogenične vrpce (91, 92). Pronefrični nefron, koji se može naći kod ličinki vodozemaca i nekih odraslih riba, sastoji se od glomerula ili glomusa, koji filtrira otpadne tvari u šupljinu (nefrocel) (93, 94). Otpadne tvari se iz nefrocela prenose kroz cilijarni nefrostom do pronefričnog tubula, koji vodi u pronefrični kanal (95–97). Za razliku od naprednijih nefrona, poput mezonefričnih i metanefričnih, gdje je Bowmanova kapsula integrirana s tubulom, pronefros ima odvojeni sustav za prikupljanje otpadnih tvari, zbog čega se naziva neintegrirani nefron (91, 93, 98).

Prabubreg (grč. mesonefros) se formira u torako-lumbalnom dijelu kralježnice i sastoji se od Wolffovog kanala i jednostavnih mezonefričkih nefrona, koji između 6. i 10. tjedna gestacije prvi put započinju filtraciju krvi i stvaranje urina (99). Kod muškaraca, dio mezonefričkih struktura ostaje i postaje dio reproduktivnog sustava, dok se u žena one postupno povlače (100).

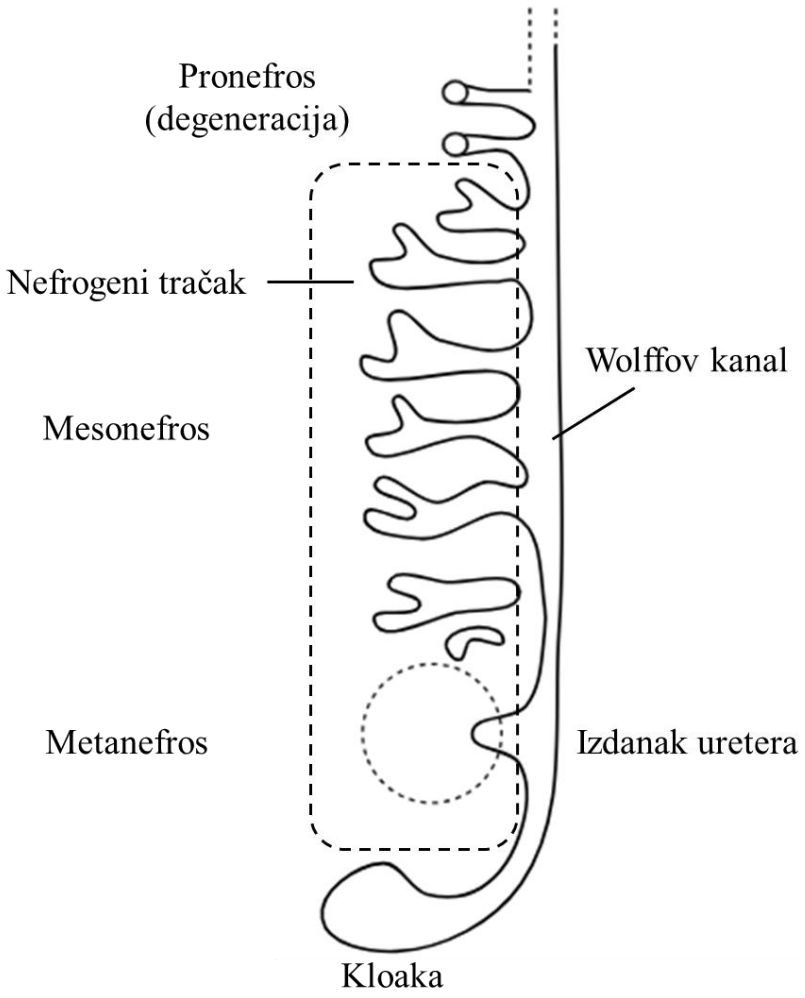
Definitivni bubreg nastaje iz dvije različite populacije stanica koje potječu iz IM: epitelni mokraćovodni pupoljak, koji se izdvaja iz metanefričkog kanala, i metanefričkog mezenhima (MM) (101–103).

U **Tablici 2**. prikazane su morfološke i funkcionalne razlike bubrega između miša i čovjeka, uključujući broj nefrona, duljinu Henleove petlje, veličinu i gustoću glomerula, te sposobnost

koncentracije urina. Također je istaknuta i njihova histološka struktura te omjer kortikalnih i jukstamedularnih glomerula u oba organizma.

Tablica 2. Usporedba morfoloških značajki bubrega miša i čovjeka (104, 105).

Kategorija	Miš	Čovjek
Komponente nefrona	Bubrežno tjelešce, proksimalni kanalić, tanki i debeli krak Henleove petlje, distalni kanalić.	Isto kao kod miša.
Broj nefrona po bubregu	Oko 14.000.	1–2 milijuna.
Duljina Henleove petlje	Većinom dugi segmenti (kortikalni i jukstamedularni u omjeru 3:1 za duge).	Većinom kratki segmenti (kortikalni i jukstamedularni u omjeru 7:1 za kratke).
Koncentracija urina	Visoka: specifična težina od 1,030–1,060 g/ml, s izraženom proteinurijom kod mužjaka.	Niža specifična težina urina i nema izražene proteinurije.
Veličina glomerula	Manji glomeruli (prosječno 73,4 µm).	Veći glomeruli (prosječno 200 µm).
Gustoća glomerula	Smanjuje se prema unutarnjim dijelovima kore bubrega.	Smanjuje se prema unutarnjim dijelovima kore bubrega.
Jukstamedularni glomeruli	Smješteni duboko u bubrežnoj kori blizu srži, veći od kortikalnih.	Smješteni duboko u bubrežnoj kori blizu srži, također veći od kortikalnih.
Sličnost bubrežnog tkiva	Slično bubregu mladog čovjeka; manji glomeruli od odraslih ljudi.	Glomeruli kod odraslih značajno veći nego kod miševa.



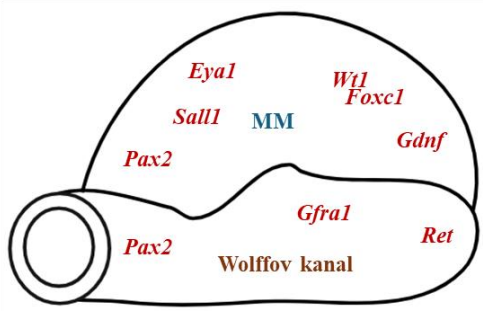
Slika 8. Generacije razvoja bubrega – pronefros, mesonefros i metanefros. Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

1.6. Geni uključeni u razvoj bubrega

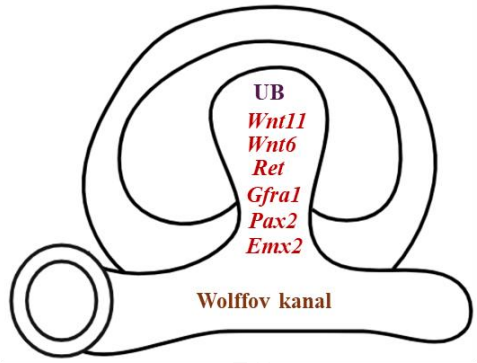
Bubreg je izuzetno koristan model za proučavanje organogeneze jer koristi brojne razvojne procese poput pupanja, međusobne indukcije tkiva, rasta i diferencijacije matičnih stanica, stanične polarizacije, prijelaza mezenhima u epitel, grananja tkiva, stvaranja krvnih žila, apoptoze, te spajanja nefrona sa sabirnim kanalićima. Osim toga, proces nefrogeneze može se uspješno pratiti i u laboratorijskim uvjetima, što olakšava njegovo istraživanje (106, 107). Odrasli bubreg sastoji se od mnogih specijaliziranih stanica, uključujući epitelne, stromalne i endotelne, pri čemu epitelne i stromalne stanice dijele zajedničko razvojno porijeklo koje se uspostavlja rano u embriogenezi, ali se njihovi razvojni putovi razdvajaju kako bubreg napreduje u razvoju (86, 108).

Gen *WT1* igra ključnu ulogu u formiranju metanefričnog mezenhima i mokraćovodnog pupoljka, a njegov nedostatak u miševa dovodi do neuspjeha u razvoju bubrega. *Pax2* također sudjeluje u regulaciji razvoja bubrega, kontrolirajući izražaj *Gdnf-a*, ključnog signala za indukciju mokraćovodnog pupoljka i njegovo grananje (107).

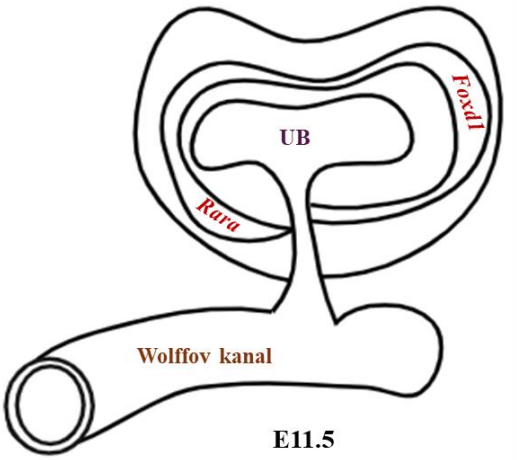
Genetske studije na miševima pokazuju da su geni *Lhx1*, *Osr1* i *Pax2/8* ključni za ranu specifikaciju intermedijarnog mezoderma (IM), a odsutnost *Lhx1* rezultira neuspjehom u formiranju nefričnog kanala. Kod dvostrukih *Pax2/8* mutanata, nefrični kanal je potpuno odsutan, što sugerira da geni *Pax* imaju preklapajuće uloge u ranom razvoju IM-a (108–111). *Odd1* (*Osr1*) je jedan od najranijih genetskih markera progenitorskih stanica bubrega u miševa i prvi se aktivira u tim stanicama, a njegov nedostatak dovodi do renalne agenezije (112–115). Geni *Hox* su od vitalnog značaja za razvoj bubrega, pri čemu se od ukupno 39 gena *Hox* njih 28 izražava tijekom ovog procesa (116). Njihova interakcija s ko-čimbenicima poput *Pax2*, *Eya1* i *SMADs* ključna je za specifičnost mezoderma bubrega (117, 118).



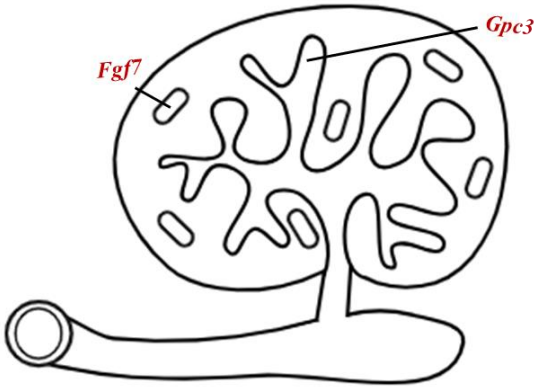
E10.5

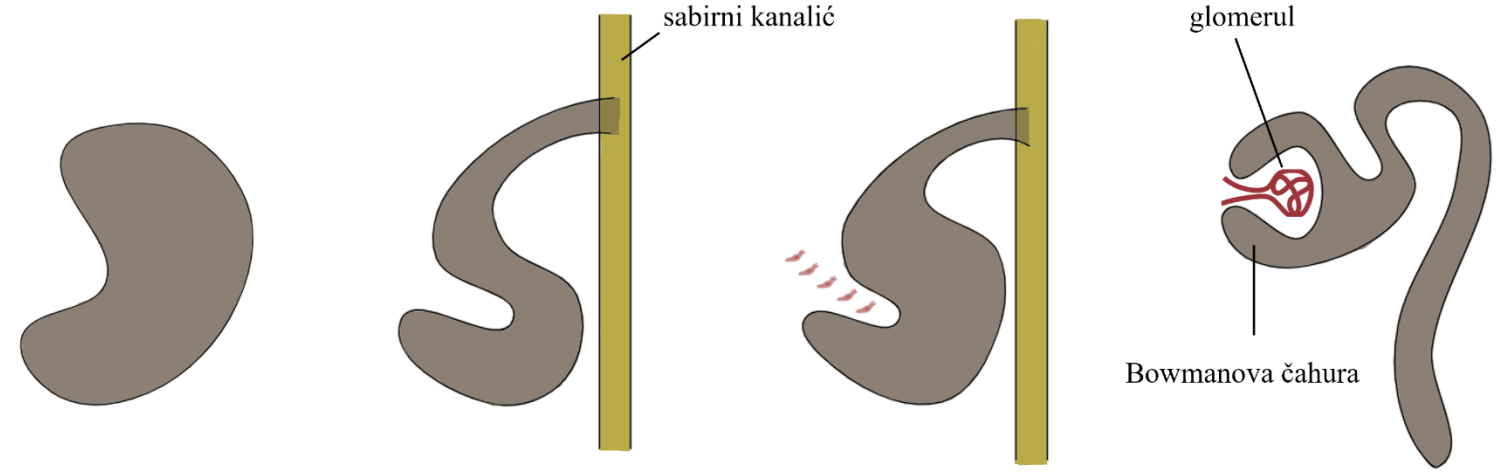


E11



E11.5



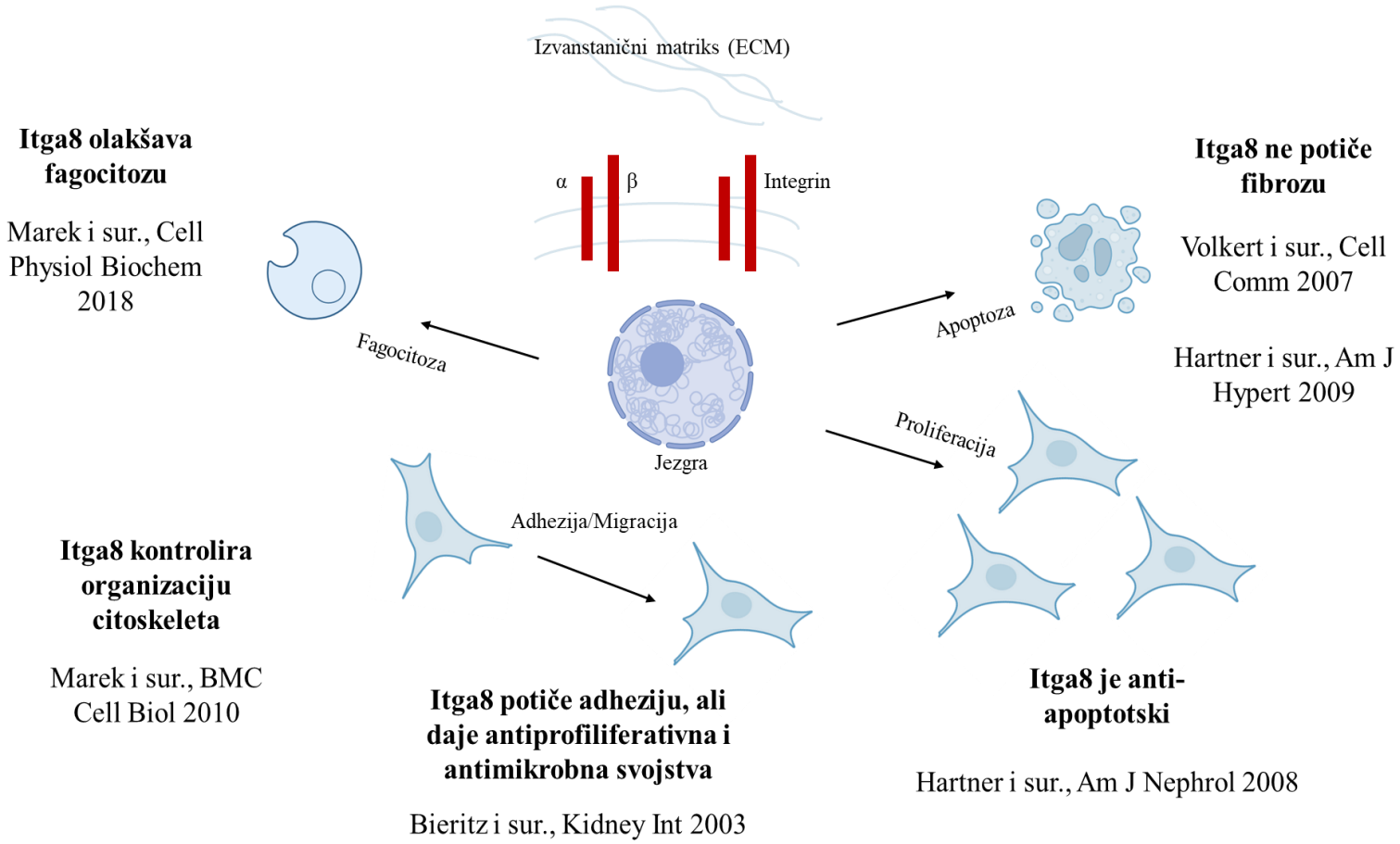


tijelo u obliku zareza | tijelo u obliku slova S | migracija endotelnih stanica | glomerulogeneza

Slika 9. Razvoj bubrega u miša započinje kada se mokraćovodni pupoljak formira na stražnjem kraju Wolffova kanala oko 10.5 dana gestacije (E10.5). Ovaj pupoljak zatim raste prema metanefričkom mezenhimu (MM) i potakne kondenzaciju mezenhima u blizini svojih vrhova, stvarajući stromalnu mezenhimalnu zonu. Od E11.5 dana gestacije nadalje, kondenzirani mezenhim uzrokuje daljnje grananje mokraćovodnog pupoljka. Tijekom ovog procesa grananja, induciraju se mezenhimalne stanice u svakom epitelnom vršnom području te prolaze kroz prijelaz iz mezenhimalnog u epitelni oblik, čime nastaje funkcionalna jedinica bubrega — nefron. Nefron se razvija prolazeći kroz faze oblika zareza i slova S. Tijelo u obliku slova S povezuje se s granom ureterskog stabla, koja se dalje spaja sa sustavom sabirnih kanalića. Endotelne stanice migriraju u novi nefron kako bi oblikovale glomerul. Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

1.7. ITGA8 u razvoju bubrega i mokraćnog trakta

Integrini su glikoproteini koji se sastoje od dvije podjedinice, alfa i beta, te igraju ključnu ulogu u staničnoj adheziji (119, 120). Integrin alfa-8 (ITGA8) je lanac integrina koji je snažno izražen u mezenhimskim i neuronskim stanicama (121), a dokazano je da ITGA8 potiče rast neurita, prianjanje stanica i širenje u neuronskim stanicama (122). ITGA8 ima ključnu ulogu u formiranju bubrega, osobito tijekom važnog razvojnog razdoblja koje karakterizira međusobno djelovanje između epitela mokraćovodnog pupoljka, koji potječe iz Wolffova kanala, i susjednog metanefričkog mezenhima. Ova interakcija je bitna za poticanje rasta mokraćovodnog pupoljka i pokretanje diferencijacije nefrona iz metanefričkog mezenhima (120, 123). Itga8 ima važnu ulogu u regulaciji rasta stanica i njihove apoptoze u glomerularnim stanicama bubrega (124). Humbert i suradnici pokazali su da mutacije u genu *ITGA8* uzrokuju obostranu ageneziju bubrega te da je to stanje, barem u određenim okolnostima, autosomno recesivno nasljedno (125).

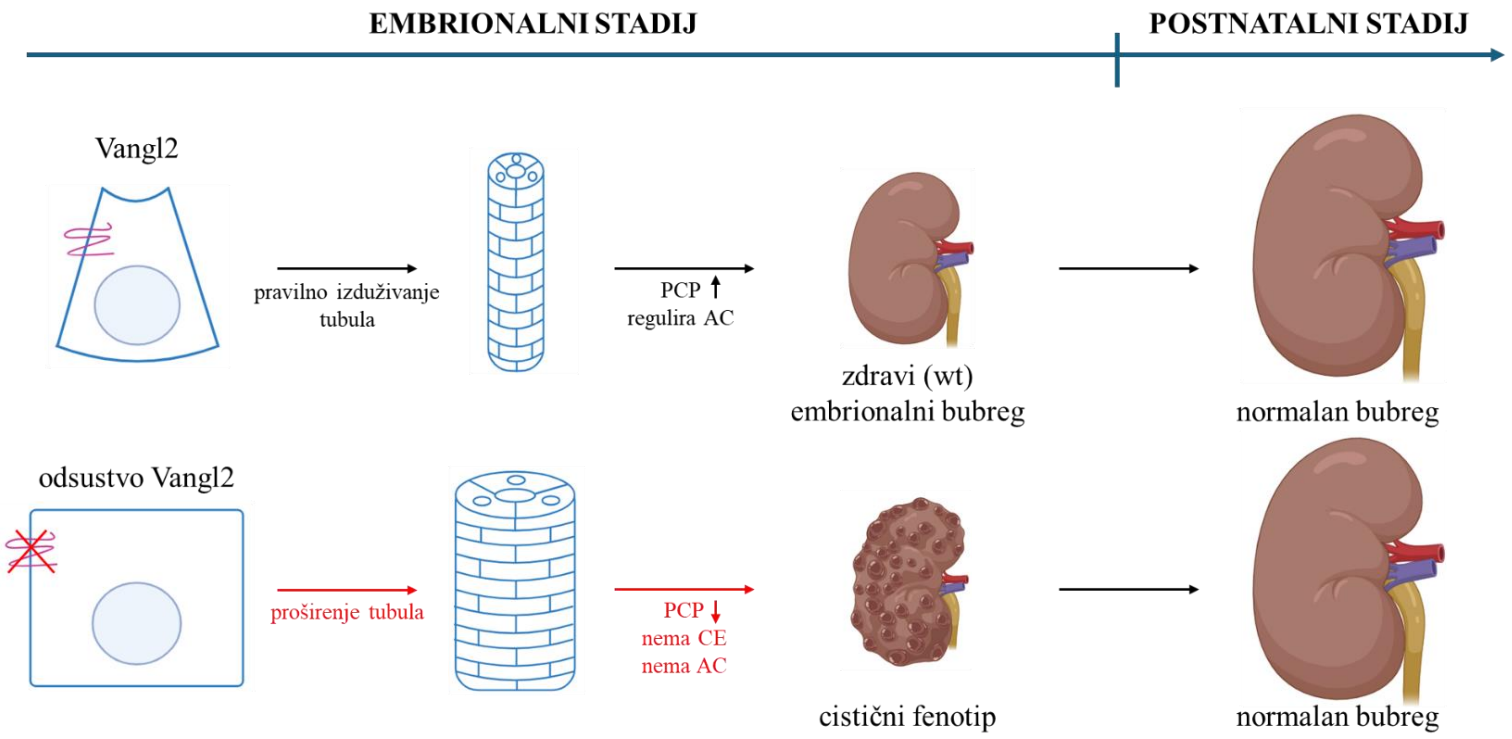


Slika 10. Skica funkcionalnih svojstava Itga8 u mezangijalnim stanicama. Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

1.8. VANGL2 u razvoju bubrega i mokraćnog trakta

Protein Van Gogh prvi put je otkriven kao regulator planarnog staničnog polariteta (PCP) u *Drosophila melanogaster*, a njegovi homolozi kod kralježnjaka VANGL1 i VANGL2 su povezani s raznim morfogenetskim procesima, uključujući polariziranu migraciju stanica tijekom zatvaranja neuralne cijevi i gastrulacije (126, 127). Van Gogh-like 2 (VANGL2), ključni protein nekonvencionalnog Wnt/Planarnog staničnog polariteta (PCP) signalnog puta, ima važnu ulogu u različitim razvojnim procesima, uključujući polariziranu migraciju stanica, neurulaciju, razvoj srca, morfogenezu grananja bubrega te regulaciju hematopoeze i organogeneze (128, 129). Što se tiče njegove fizičke strukture, VANGL2 je membranski protein stanice koji ima četiri uzastopne

transmembranske domene u svojoj N-terminalnoj polovici (130). Derish i suradnici pokazali su da VANGL2 kontrolira tubulogenezu bubrega tijekom embrionalne faze. Ova opažanja mogu upućivati na to da su prirođene bubrežne anomalije unutar CAKUT spektra možda uzrokovane poremećajima u PCP signalizaciji (16).



Slika 11. Tijekom embrionalnog razvoja bubrega, normalno PCP signaliziranje u divljem tipu bubrega regulira veličinu tubula kontrolirajući konvergentno produljenje (CE) i apikalnu kontrakciju (AC), čime održava veličinu tubula unutar uskog raspona. U embrionalnim bubrezima Vangl2 i drugih PCP mutanata, kontrola nad CE i AC je poremećena, što rezultira širenjem tubula i stvaranjem mikrocista. Nakon rođenja, proširenje tubula smanjuje se djelovanjem nepoznatog mehanizma koji nije povezan s PCP-om. Izradio Nikola Pavlović u programu *Biorender*.

2. HIPOTEZA I CILJEVI

2.1. Hipoteza istraživanja

S obzirom da su proteini ITGA8 i VANGL2 važni za razvoj i normalnu funkciju bubrega, za pretpostaviti je da njihov promijenjen obrazac tijekom fetalnog i postnatalnog razvoja u čovjeka i miša može dovesti do razvoja urođenih anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT-a).

2.2. Ciljevi istraživanja

Cilj ovoga istraživanja je pomoću imunofluorescencijske analize odrediti prostorni i vremenski obrazac proteina ITGA8 i VANGL2 u bubrezima normalnih, zdravih te CAKUT humanim fetalnim uzorcima. Isto tako ovo istraživanje ima za cilj odrediti utjecaj utišavanja gena *Dab1* na izražaj proteina Itga8 i Vangl2 u embrionalnim i postnatalnim uzorcima miša.

Specifični ciljevi istraživanja:

- Istražiti i izmjeriti vremensku i prostornu raspodjelu proteina ITGA8 i VANGL2 u bubrezima tijekom različitih faza razvoja (CTRL) i u bubrezima zahvaćenim CAKUT-om u periodu od 15. do 41. tjedna fetalnog razvoja, koristeći indirektnu imunofluorescenciju.

- Istražiti i izmjeriti vremensku i prostornu raspodjelu proteina Itga8 i Vangl2 u različitim strukturama bubrega u *Dab1-/-* (*yotari*) i kontrolnih miševa u gestacijskim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5), te 4. (P4) i 14. (P14) postnatalnog dana, koristeći indirektnu imunofluorescenciju.

- Ispitati razlike u prostornoj i vremenskoj raspodjeli proteina ITGA8 i VANGL2 između ljudi i miševa u odgovarajućim razvojnim fazama pomoću imunofluorescencije.

- Analizirati razinu izražaja gena *ITGA8* i V*ANGL2* s javno dostupne baze podataka transkriptoma GEO dataset (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds) na zdravim i CAKUT uzorcima čovjeka i miša.

- Razmotriti potencijalne opcije za liječenje CAKUT patoloških stanja u budućnosti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etička načela

Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split i Medicinskog fakulteta u Splitu (klasa: 003-08/23-03/0015, broj: 2181-198-03-04-23-0073). Podatci prikupljeni u ovom istraživanju namijenjeni su isključivo za potrebe znanstvenih istraživanja i neće biti korišteni u druge svrhe.

3.2. Ljudsko fetalno bubrežno tkivo

Ljudsko bubrežno tkivo dio je arhive Odjela za patologiju Kliničkog bolničkog centra Split, a dobiveno je nakon spontanog gubitka trudnoće i eugeničkih pobačaja, a koji su bili obilježeni teškim nepravilnostima. Uzorkovanje tkiva izvršeno je u skladu s Helsinškom deklaracijom, a prethodilo mu je odobrenje od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra u Splitu i Medicinskog fakulteta u Splitu (referenca: 003-08/23-03/0015, broj odobrenja: 2181-198-03-04-23-0073). Za ovo istraživanje korišteno je ukupno trideset parafinskih blokova postmortalnog fetalnog bubrežnog tkiva, u rasponu od 15. do 41. gestacijskog tjedna (**Tablica 3.**). Gestacijska dob određena je na temelju udaljenosti od tjemena do trtice i menstrualnih podataka trudnice, dok se klasifikacija bubrežne patologije temeljila na standardnom histopatološkom pregledu i procjeni makroskopske morfologije. Bubrežno tkivo fiksirano je u 4% paraformaldehidu (PFA) (pH 7,4) uz prilagođeno vrijeme fiksacije, disecirano u blokove i obrađeno kroz rastuće koncentracije etanola prije nego što je ugrađeno u parafin. Tkivo je serijski rezano na mikrotomu debljine od 5 µm. Bojenje hematoksilinom i eozinom (H&E) izvedeno je standardiziranim postupkom na svakom desetom rezu kako bi se osigurala odgovarajuća očuvanost tkiva. Stadiji normalnog razvoja fetalnog bubrega i nepravilnosti u CAKUT bubrezima ispitivani su pomoću svjetlosne mikroskopije.

Tablica 3. Ispitani uzorci ljudskih fetalnih bubrega (n = 30).

Grupa	Razvojna faza	Patologija i povezane bolesti	Gestacijska faza	Broj uzoraka bubrega
Zdravi bubreg (CTRL)	Ph2	N/A	15	1
		N/A	16	1
		N/A	17	1
		N/A	18	2
		N/A	21	1
	Ph3	N/A	23	2
		N/A	28	3
		N/A	29	1
		N/A	32	1
		N/A	35	1
	Ph4	N/A	37	1
		N/A	38	1
Potkovasti bubreg (HK)	*Ren concreatus arcuatus, cystae multiplices corticales*		22	1
	Ren concreatus arcuatus, tetras Fallot		26	1
	Syndroma Edwards, Ren arcuatus		30-31	1
	Syndroma Edwards, Ren arcuatus		34	1
Displastični bubreg (DYS)	*Megaureter lateris dextri, Dysplasia renis*		21	1
	Dysplasia multicystica renis dextri		27	1
	Cystes parvae focales			
	Renes dysplastici cystici, Syndroma Potter		35	1
	Agenesis renis dextri et dysplasia renis sinistri cum ureter duplex		37	1
	Dysplasia hypoplastica, renis bilateralis, syndroma Down, syndroma Potter		38	1
Hipoplastični bubreg (HYP)	*Hypoplasia renis lateris sinistri*		37	1
	Hypoplasia renis		38	1

Bubrezi s udvostručenim ureterom (DK)	*Ureter duplex lateris dextri*	24	1
	Ureter duplex lateris sinistri	30	1
	Pyelon et ureter duplex bilateralis	41	1

3.3. Životinjsko embrionalno i postnatalno bubrežno tkivo

Miševi s heterozigotnim genom *Dab1* (Jackson Laboratories) uzgajani su kroz više generacija kako bi se postigla homozigotnost. Ovaj proces križanja omogućio je dobivanje jedinki sa stabilnim homozigotnim genotipom, što je bilo ključno za daljnja istraživanja. Miševi C57BL/6N uzgajani su u standardnim polikarbonatnim kavezima s neograničenim pristupom hrani i vodi, uz održavanje ciklusa svjetlo/tama u trajanju od 12 sati te temperature 23±2°C. U svakom kavezu bila je barem jedna životinja svakog genotipa: divlji tip (wt), heterozigotni tip i *Dab1-/-* (*yotari*) tip pokusne životinje. Svaka istraživana skupina uključivala je tri do sedam životinja za svaki genotip.

Gravidne mišice žrtvovane su u stadijima E13.5 i E15.5, a njihovi embriji pohranjeni su u 4% otopini PFA. Miševi u stadijima P4 i P14 duboko su anesteziranі i transkardijalno perfundirani s 0,1 M fiziološkom otopinom puferiranu fosfatom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) i 4% PFA otopinom. Bubrezi su izdvojeni i fiksirani u 4% PFA u 0,1 M PBS-u preko noći.

Iz mišjih repova uzorci DNA izolirani su korištenjem *Qiagen* kompleta, a genotipizacija je izvršena metodom polimerazne lančane reakcije (PCR). Za PCR analizu korištene su sljedeće početnice:

Za *yotari: GCCCTTCAGCATCACCATGCT* i *CAGTGAGTACATATTGTGTGAGTTCC*.

Za divlji tip: *GCCCTTCAGCATCACCATGCT* i *CCTTGTTTCTTTGCTTTAAGGCTGT*.

3.4. Određivanje veličine uzorka

Veličina uzorka se odredila pomoću Meadove jednadžbe resursa (The Resource equation method (Mead 1988)), a koja se često koristi za određivanje optimalne veličine uzorka potrebne za postizanje pouzdanih i valjanih rezultata u laboratorijskim pokusima.

E = N – B – T, odnosno E + B + T = N;

20 + 3 + 1 = 24 (11 wt + 12 *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, koristili smo tri životinje po pojedinom razvojnom stadiju za divlji tip i *yotari* miša. Svaka ispitivana skupina sadržavala je tri do sedam životinja svakog genotipa, što znači da je uzorak bio više nego dovoljan.

3.5. Bojenje hematoksilinom i eozinom (H&E)

Hematoksilin & eozin (H&E) bojenje korišteno je za histološku analizu tkivnih struktura prema sljedećem protokolu. Mayerov hematoksilin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) nanesen je na tkiva tijekom deset minuta, nakon čega su tkiva bila uronjena u vodu na deset minuta. Citoplazmatsko bojenje preparata izvedeno je uranjanjem u Phloxin B (Merck Millipore, Burlington, MA, SAD) i Eozin Y (žućkasti) (Merck Millipore) u omjeru 1:2 tijekom jedne minute. Nakon što su dehidrirani u postupno rastućim koncentracijama etanola (70%, 95%, 100%, 100%) i ksilenu, na rezove je dodan kanadski balzam (Claro-Prom, Zagreb, Hrvatska) s pokrovnim stakalcem.

3.6. Imunofluorescencija (IF) na postmortalnom ljudskom prenatalnom bubrežnom tkivu

Prije provođenja imunofluorescencijskog (IF) protokola, izveden je standardizirani postupak uklanjanja parafina iz presjeka tkiva pomoću ksilola i padajućih koncentracija etanola (100%, 100%, 95%, 70%). Otkrivanje epitopa izvedeno je kuhanjem mikroskopskih preparata 30 minuta u 0,01 M puferu natrijevog citrata (pH 6,0). Nakon toga, preparati su ostavljeni na sobnoj temperaturi 45 minuta kako si ohladili. Preparati su tri puta ispirani u PBS-u, a oko tkivnih presjeka napravljen je krug hidrofobnim flomasterom kako ne bi došlo do miješanja protutijela među presjecima na istom stakalcu. Zatim je na presjeke tkiva nanesena blokirajuća otopina (Protein Block, ab64226, Abcam, Cambridge, UK) u trajanju od 20 minuta. Nakon toga, blokirajuća otopina zamijenjena je primarnim protutijelima razrijeđenim u PBS-u, te su presjeci tkiva inkubirani preko noći u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, presjeci tkiva su isprani u PBS-u, a odgovarajuća sekundarna protutijela dodana su i inkubirana jedan sat na sobnoj temperaturi. Nakon tri ispiranja u PBS-u, presjeci tkiva su inkubirani dvije minute s DAPI (4′,6-diamidino-2-fenilindol) fluorescentnom bojom (Abcam, Cambridge, UK), koja se specifično veže za DNA, i prekriveni pokrovnim stakalcima pomoću medija za preklapanje (Immuno-Mount, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Kao kontrola za osiguravanje specifičnosti bojenja tijekom postupka bojanja korištena je metoda isključenja primarnih protutijela. Protutijela korištena u ovoj studiji navedena su u **Tablici 4**.

Tablica 4. Primarna i sekundarna protutijela korištena za imunohistokemijsko bojenje.

	Protutijelo	**Kataloški broj**	**Domaćin**	**Razrjeđenje**	**Proizvođač**
Primarna	Anti-ITGA8 protutijelo	AMAb91468	miš	1:200	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Anti-VANGL2 protutijelo	AF4815	ovca	1:50	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Sekundarna	Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor® 488	711-545-150	magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (Baltimore, PA, USA)

	Protutijelo	Kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
	Anti-Goat IgG (H + L), Alexa Fluor® 488	705-545-003	magarac	1:300	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (Baltimore, PA, USA)

3.7. Prikupljanje podataka i analiza slika

Promatranje preparata je provedeno korištenjem epifluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51, Tokio, Japan), a fotografije su snimljene pomoću Nikon DS-Ri2 kamere (Nikon Corporation, Tokio, Japan) uz korištenje softvera NIS-Elements F (verzija 5.22.00). Proteini ITGA8 i VANGL2 ispitivani su u najmanje deset nepreklapajućih, reprezentativnih regija fetalne kore bubrega. Sve slike snimljene su pri povećanju od 40x uz dosljedno trajanje ekspozicije. Pozitivno bojenje za proteine ITGA8 i VANGL2 prikazano je kao difuzno ili točkasto zeleno bojenje.

Analiza slika provedena je pomoću softvera ImageJ (verzija 1.54, National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Postotak fluorescencijskog područja određen je pomoću opcije "analyze particles". U početku je curenje fluorescencije minimizirano oduzimanjem crvenog protusignala od zelene fluorescencije. Slike su duplicirane, a medijan filtar s radijusom od 7,0 piksela primijenjen je na jednu od slika. Pozitivni signal izoliran je oduzimanjem filtriranih slika od nefiltriranih. Nakon toga, dobivene slike pretvorene su u 8-bitne slike i podešene pomoću metode praga (konkretno, algoritmom trokutastog praga). Kako bi se riješile moguće razlike među promatračima, tri stručna histologa neovisno su analizirala snimljene mikrofotografije, postavljajući pragove pozadine koristeći negativne kontrolne slike. Međusobni dogovor ocjenjivan je analizom međurazredne korelacije, koja je dala koeficijent veći od 0.8, što ukazuje na izvrsno slaganje.

3.8. Statistička analiza

Svi izračuni provedeni su u Excelu v2403 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD). Statističke analize izvršene su korištenjem softvera GraphPad v8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD), pri čemu je razina značajnosti postavljena na $p < 0,05$. Simboli koji označavaju različite razine statističke značajnosti su sljedeći: „ns“ za $p > 0,05$ označava da rezultat nije značajan, * označava $p < 0,05$, ** označava $p < 0,001$, *** označava $p < 0,0001$, a **** označava $p < 0,00001$. Normalnost distribucije podataka testirana je pomoću Shapiro–Wilkovog testa. Podatci su pokazali normalnu distribuciju. Usporedbe grupa za imunoekspresiju provedene su koristeći jednosmjerni ANOVA test, nakon kojeg je slijedio *post hoc* Tukeyev test.

Linearna i nelinearna regresijska modeliranja korištena su za analizu dinamike i trendova izražaja promatranih proteina kroz četiri razvojne faze zdravih kontrolnih bubrega. To je uključivalo izračun prosječnih vrijednosti postotka površine kore bubrega preko uzoraka koji predstavljaju različite razvojne faze. Koeficijenti, definirani kao procjene točke ± standardna pogreška, korišteni su u modelima opisa trendova, dok je koeficijent determinacije (R^2) služio kao mjera za procjenu kvalitete pristajanja. Nagib (β) linearne regresijske linije korišten je za opis linearnih trendova.

Grafovi su izrađeni pomoću GraphPad Prism 8.4.3, dok su figure sastavljene koristeći Adobe Photoshop softver v9.0 (CS2). Kako bi se poboljšala prezentacija i kvaliteta mikrofotografija primijenjeno je poboljšanje kontrasta i smanjenje pozadine.

3.9. Validacija izražaja gena *ITGA8* i *VANGL2* iz javno dostupnih baza podataka

Javno dostupna baza podataka Gene Expression Omnibus (GEO; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/) korištena je za provjeru izražaja gena *ITGA8* i *VANGL2*. Pretraga baze obavljena je s ključnom riječi „CAKUT“ dana 25. kolovoza 2024. Kriteriji za uključivanje relevantnih studija uključivali su: uzorke ljudskih pacijenata ili miševa, podatke dobivene metodama microarray-a ili RNA sekvenciranja, te prisutnost informacija o izražaju oba gena od interesa. Dva skupa podataka, *GSE83946* i *GSE85976*, preuzeta su i analizirana radi istraživanja izražaja gena *ITGA8* i *VANGL2*, povezanih s razvojem ove bolesti. Vrijednosti izražaja

ciljnih gena unesene su i statistički obrađene u programu Excel v2403 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD).

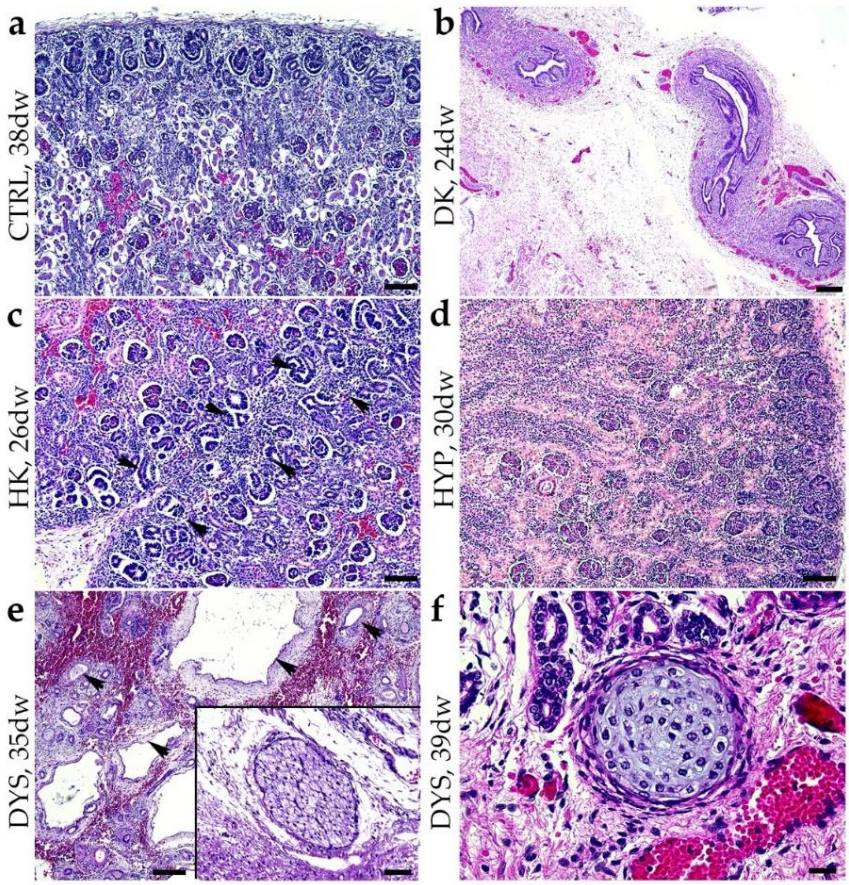
Normalizirani podatci o izražaju ta dva ciljana gena obrađeni su korištenjem sljedećih R paketa: illuminaHumanv3.db v1.26.0 (131) i reshape2 v1.4.4 (132). Za grafički prikaz rezultata validacije korišteni su R paketi: ComplexHeatmap v2.18.0 (133), ggpubr v0.6.0 (134) i multipanelfigure v2.1.6 (135). U ovoj validacijskoj studiji korišteno je R softversko okruženje za statističko računanje i grafiku, verzija 4.3.2 (136).

4. REZULTATI

4.1. Histološka analiza normalnog, zdravog fetalnog bubrega (CTRL) i različitih fenotipova fetalnih bubrega zahvaćenih urođenim anomalijama bubrega (CAKUT)

Hematoksilin i eozin (H&E) bojenje je korišteno za procjenu histoloških karakteristika normalnih i patoloških bubrega. **Slika 12.** prikazuje različite razvojne faze bubrega, a one uključuju normalni, zdravi bubreg (CTRL) te nekoliko fenotipova urođenih anomalija bubrega (CAKUT) – bubreg s udvostručenim ureterom (DK), potkovasti bubreg (HK), hipoplastični bubreg (HYP) i displastični bubreg (DYS). Svaka slika (**12a-f**) ilustrira ključne strukturne razlike između normalnog, zdravog bubrega i onih s CAKUT-om.

CTRL ima jasno razvijeno nefrogeno područje s podocitima kubičnog oblika (**Slika 12a**). Unatoč tome što bubrežno tkivo pod mikroskopom izgleda uredno, DK sadrži dva uretera (**Slika 12b**). HK pokazuje prisutnost dvaju nefrogenih zona s primitivnim pojasom na kojemu se formiraju glomeruli i tubuli (**Slika 12c**). HYP iako nalikuje normalnom bubregu, ima užu nefrogenu zonu i manji broj nefrona (**Slika 12d**). DYS pokazuje nepravilnosti u razvoju nefrona i tubula, s nepravilno raspoređenim strukturama i cistama (**Slika 12e-f**).

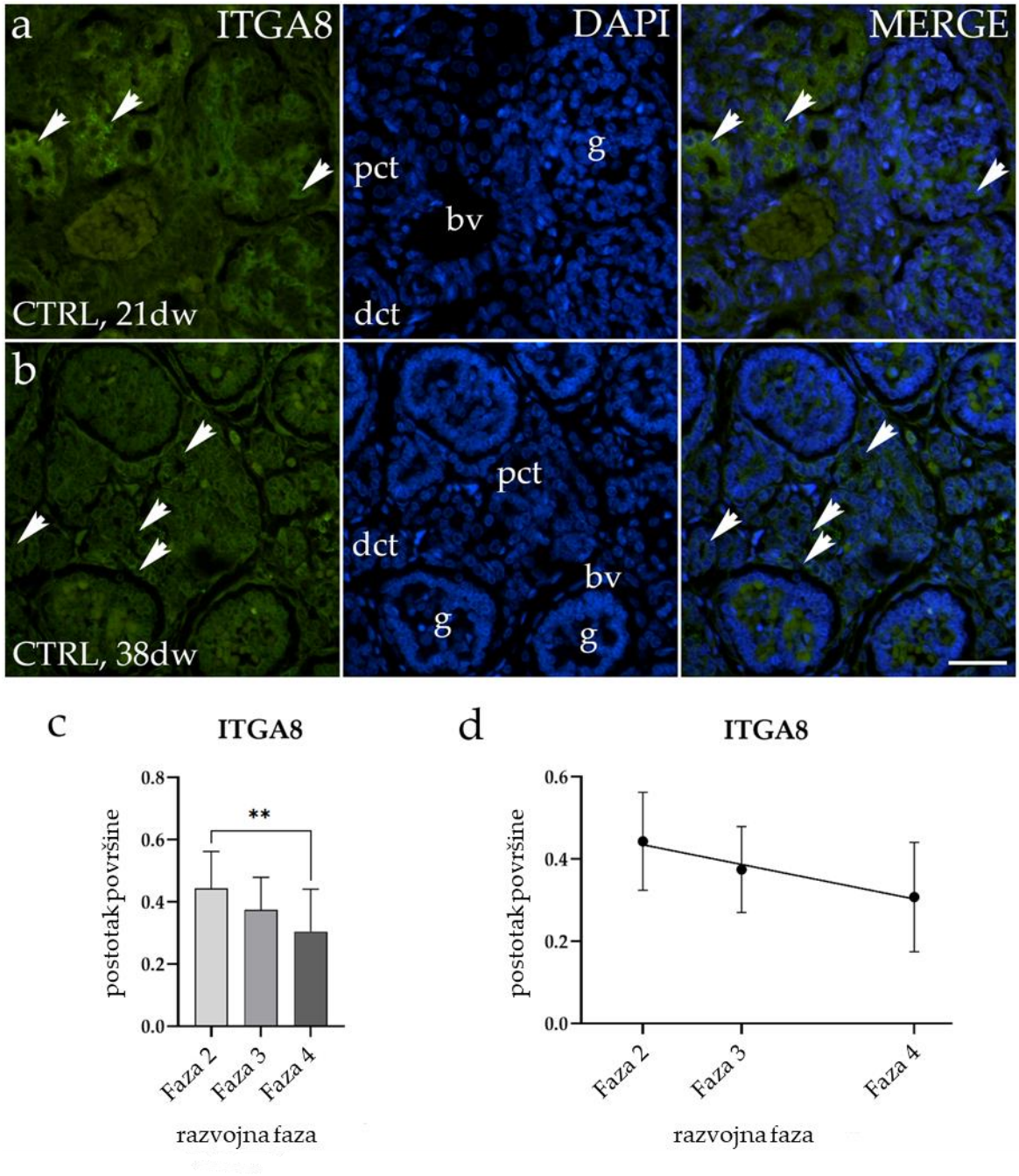


Slika 12. Hematoksilin i eozin (H&E) bojenje normalnih, zdravih bubrega (CTRL) u 38. razvojnom tjednu (dw) (**a**) i bubrega zahvaćenim urođenim anomalijama (CAKUT): bubreg s udvostručenim ureterom (DK) u 24. razvojnom tjednu (**b**), potkovasti bubreg (HK) u 26. razvojnom tjednu (**c**), hipoplastični bubreg (HYP) u 30. razvojnom tjednu (**d**), displastični bubreg (DYS) u 35. razvojnom tjednu (**e**) i 39. razvojnom tjednu (**f**). Strelice pokazuju najkarakterističnije strukture zabilježene za svaki fenotip. Slike su snimljene pri povećanju od 4× (**b**), 10× (**a**,**c**–**e**) i 40× ((**f**), umetnuti dio). Mjerne trakice (engl. *scale bar*) su 20 μm ((**f**) umetnuti dio), 100 μm (**a**,**c**–**e**) i 200 μm (**b**).

4.2. Izražaj proteina ITGA8 u normalnim, zdravim bubrezima tijekom fetalnog razvoja

Prostorno-vremenski izražaj proteina ITGA8 u normalnim, zdravim fetalnim bubrezima (CTRL) prikazan je difuznim zelenim signalom unutar citoplazme visceralnog sloja Bowmanove čahure (g), proksimalnih kanalića (pct) i distalnih kanalića (dct). Uočene su značajne razlike u intenzitetu imunofluorescencijskog signala između 21. razvojnog tjedna (Faza 2) i 38. razvojnog tjedna (Faza 4) kod CTRL bubrega (**Slika 13a**, **b**).

Usporedbom postotka površine ITGA8-pozitivnih stanica u normalnim, zdravim fetalnim bubrezima otkriveno je da se obrazac izražaja ITGA8 značajno smanjuje tijekom fetalnog starenja ($p < 0,5$, **Slika 13c**). Nije pronađena statistički značajna razlika prilikom provođenja formalnog testa za linearan trend među promatranim razvojnim fazama ($R2 = 18,51\%$, $\beta = -0,005989 \pm 0,00379$, **Slika 13d**).



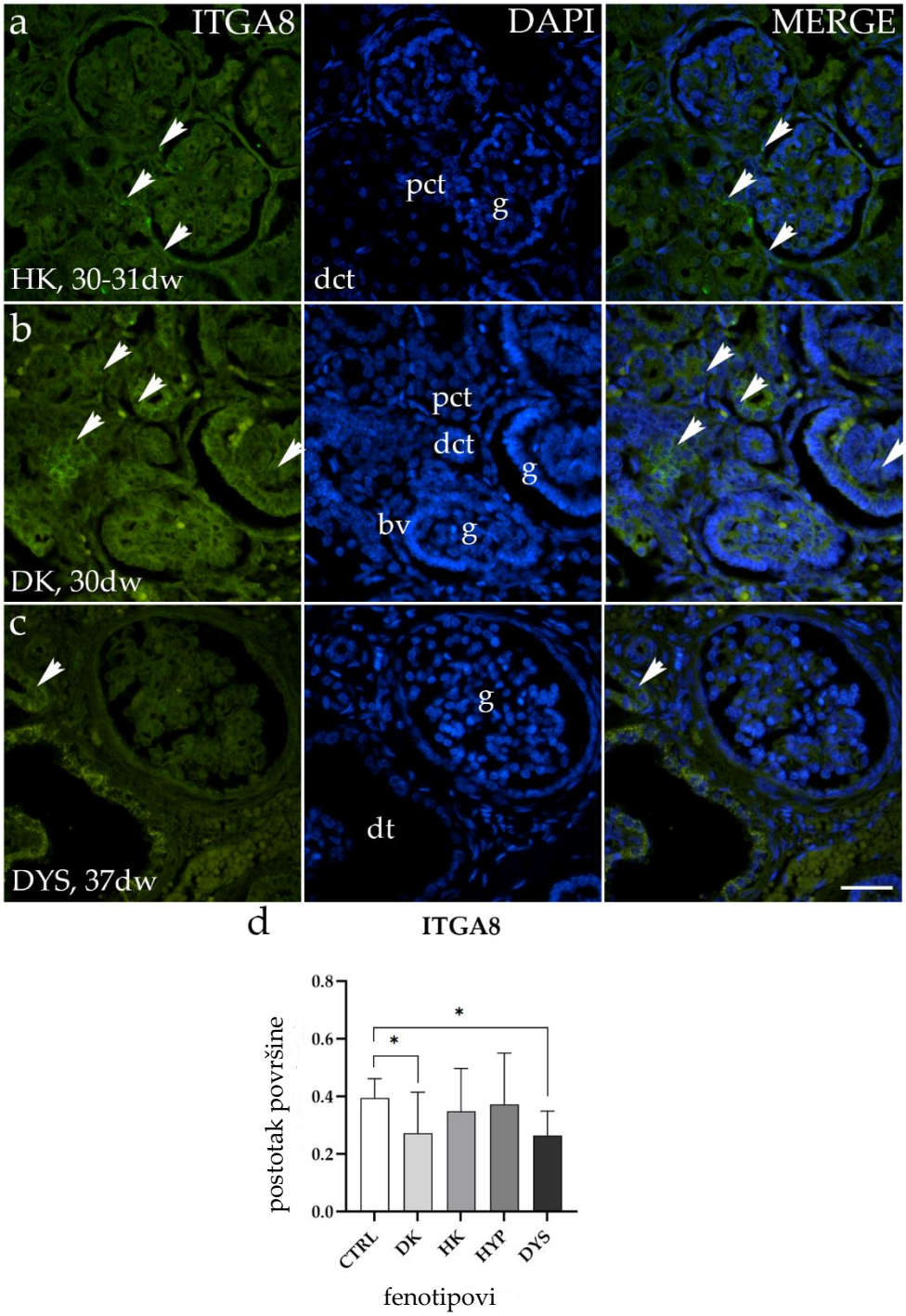
Slika 13. Prikaz imunofluorescencijskog bojenja normalnih, zdravih ljudskih fetalnih bubrega (CTRL) korištenjem protutijela specifičnim za alfa-8 integrin (ITGA8) (**a**,**b**). Strelice prikazuju izražaj ITGA8 u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim tubulima (pct) i distalnim zavijenim tubulima (dct), kako je prikazano uz pomoć bojenja 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Prikazane su slike imunoekspresije ITGA8, DAPI bojenja, te preklopljene slike ITGA8 i DAPI u CTRL-u u 21. (**a**) i 38. razvojnom tjednu (dw) (**b**). Sve slike su snimljene pri povećanju od 40×,

a mjerna trakica (engl. *scale bar*) na svim slikama je 100 μm. Postotak područja ITGA8-pozitivnih stanica u normalnim, zdravim fetalnim bubrežnim tkivima tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4 (**c**). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (okomita crta) i analizirani su korištenjem ANOVA testa s jednim faktorom, praćeni Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Značajne razlike su označene sa ** $p < 0.01$. Svaka razvojna faza je analizirana na temelju najmanje deset reprezentativnih slika po promatranom području. Dinamika izražaja ITGA8 (**d**) prikazana je korištenjem linearnog i nelinearnog regresijskog modeliranja postotka područja kroz razvojne faze fetalnog bubrežnog tkiva CTRL-a. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

4.3. Izražaj proteina ITGA8 u različitim CAKUT fenotipovima

U istraživanju izražaja proteina ITGA8 u različitim CAKUT fenotipovima, pronađeno je da obrasci bojenja u potkovastim bubrezima (HK) i hipoplastičnim bubrezima (HYP), pokazuju sličnosti u pogledu lokalizacije i intenziteta (**Slika 14a**). Kod bubrega s udvostručenim ureterom (DK) i displastičnih bubrega (DYS), ITGA8 pokazuje niske razine izražaja, uglavnom unutar glomerula (g) i okolnog vezivnog tkiva (**Slika 14b, c**).

Usporedbom postotka površine izražaja između normalnih, zdravih bubrega (CTRL) i onih s urođenim anomalijama bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT), rezultati su pokazali da HK i HYP imaju sličan izražaj kao CTRL, bez značajnih razlika, dok je u DK i DYS uočena značajna razlika ($p < 0,5$, **Slika 14d**).



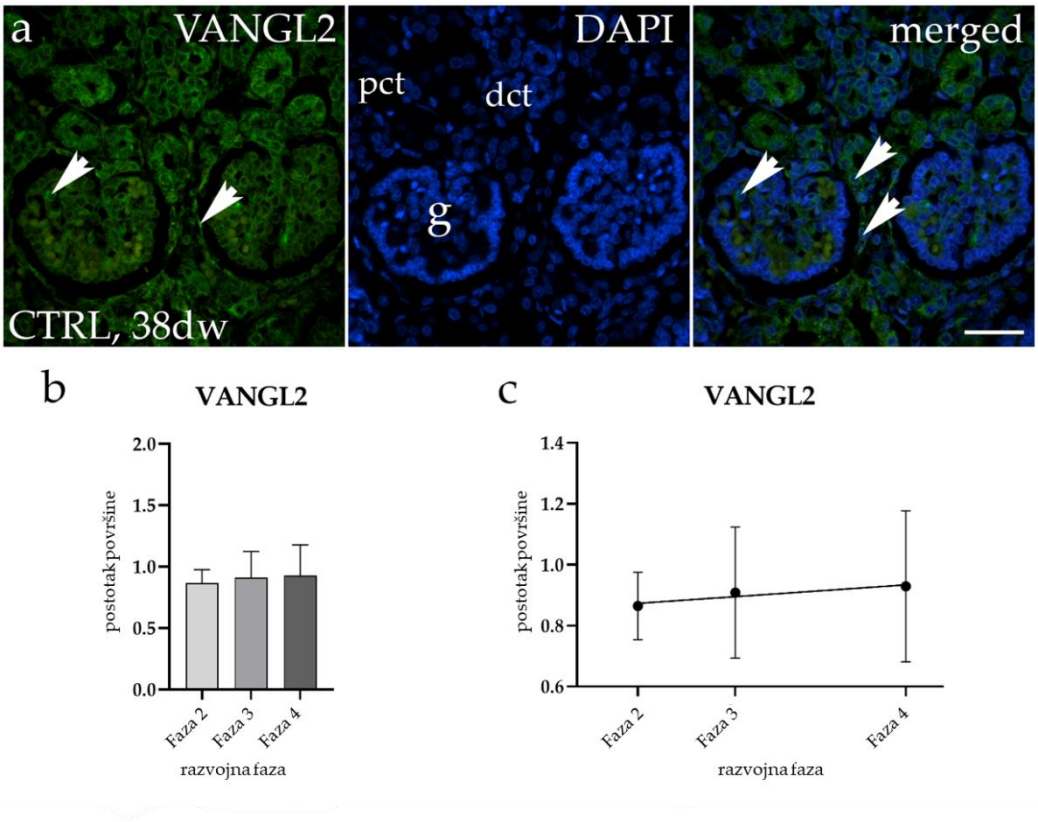
Slika 14. Prikaz imunofluorescencijskog bojenja ljudskih fetalnih bubrega korištenjem protutijela specifičnim za alfa-8 integrin (ITGA8) (**a**–**c**). Strelice prikazuju izražaj ITGA8 u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (dct) i displastičnim tubulima (dt), kako je prikazano uz pomoć bojenja 4′,6-diamidino-2-fenilindolom

(DAPI). Prikazane su slike imunoekspresije ITGA8 i DAPI bojenja, te preklopljene slike ITGA8 i DAPI u potkovastom bubregu (HK) u 30.–31. razvojnom tjednu (dw) (**a**), bubregu s udvostručenim ureterom (DK) u 30. razvojnom tjednu (**b**) i displastičnom bubregu (DYS) u 37. razvojnom tjednu (**c**). Sve slike su snimljene pri povećanju od 40×, a mjerna trakica (engl. *scale bar*) na svim slikama je 100 μm. Postotak područja ITGA8-pozitivnih stanica u fetalnim bubrežnim tkivima DK, HK, HYP i DYS (**d**). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (okomita crta) i analizirani korištenjem ANOVA testa s jednim faktorom, praćeni Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Značajne razlike su označene sa * $p < 0.05$. U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je najmanje deset reprezentativnih slika.

4.4. Izražaj proteina VANGL2 u normalnim, zdravim bubrezima tijekom fetalnog razvoja

Prostorno-vremenski izražaj proteina VANGL2 u normalnim, zdravim fetalnim bubrezima (CTRL) prikazan je kao difuzni zeleni signal u citoplazmi glomerula (g), proksimalnih kanalića (pct) i distalnih kanalića (dct). Međutim, nije uočena razlika u obrascu izražaja između različitih faza CTRL uzoraka (**Slika 15a**).

Nadalje, usporedba postotka površine VANGL2-pozitivnih stanica u normalnim, zdravim fetalnim bubrezima pokazala je da izražaj VANGL2 ostaje konstantan tijekom fetalnog starenja (**Slika 15b**). Nije pronađena statistički značajna razlika pri provođenju formalnog testa za linearan trend među promatranim fazama razvoja ($R2 = 18{,}94\%$, $\beta = 0{,}002764 \pm 0{,}006336$, **Slika 15c**).

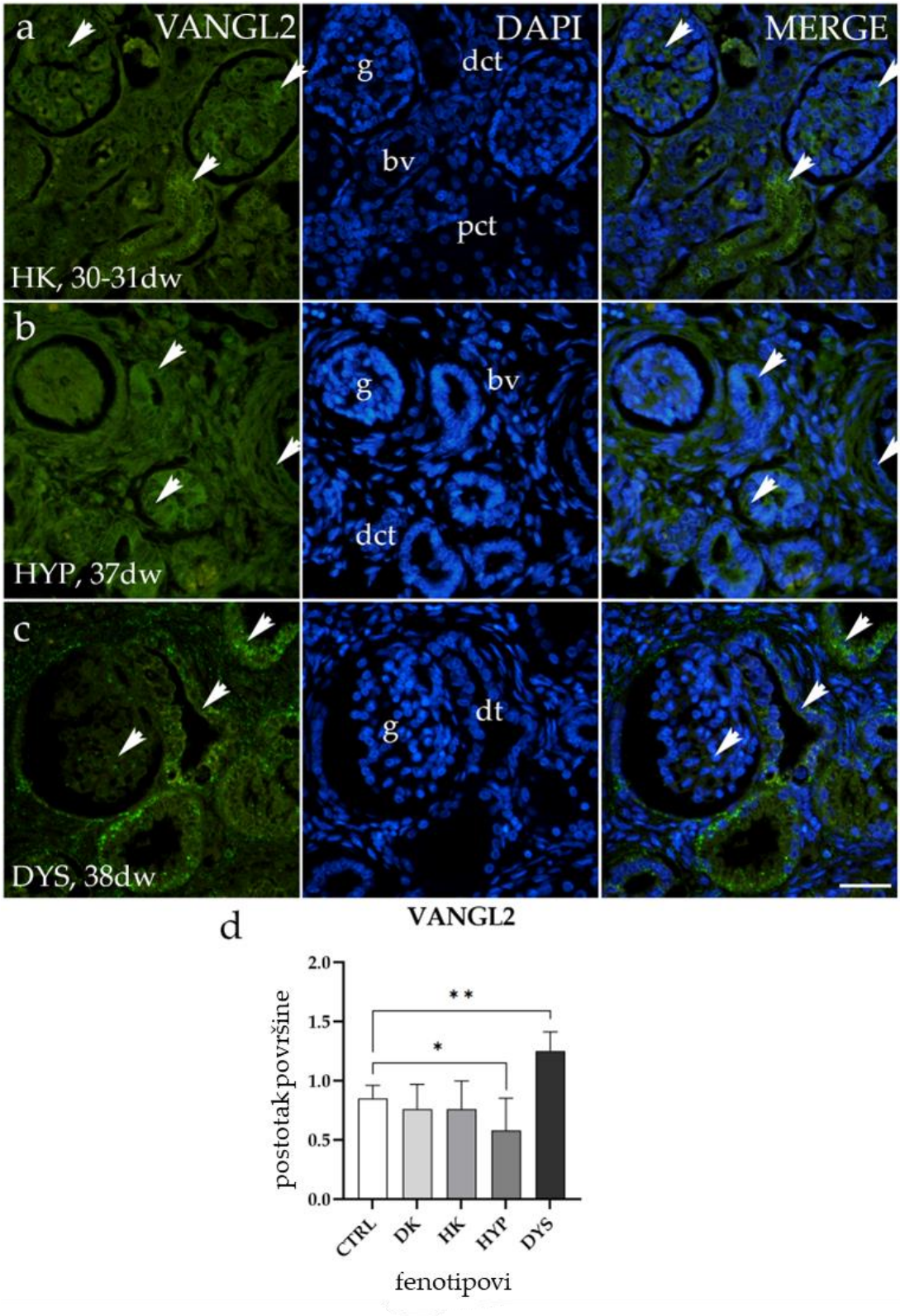


Slika 15. Prikaz imunofluorescencijskog bojenja normalnih, zdravih ljudskih fetalnih bubrega (CTRL) korištenjem protutijela specifičnim za Van Gogh-like 2 (VANGL2) (**a**). Strelice prikazuju izražaj VANGL2 u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim tubulima (pct) i distalnim zavijenim tubulima (dct), kako je prikazano uz pomoć bojenja 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Prikazane su slike imunoekspresije VANGL2, DAPI bojenja, te preklopljene slike VANGL2 i DAPI za CTRL u 38. razvojnom tjednu (dw) (**a**). Sve slike su snimljene pri povećanju od 40×, a mjerna trakica (engl. *scale bar*) na svim slikama je 100 µm. Postotak područja VANGL2-pozitivnih stanica u normalnim, zdravim fetalnim bubrežnim tkivima tijekom razvojnih faza 2, 3 i 4 (**b**). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (okomita crta) i analizirani korištenjem ANOVA testa s jednim faktorom, praćeni Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Nisu zabilježene značajne razlike. U svakoj razvojnoj fazi procijenjeno je najmanje deset reprezentativnih slika po promatranom području. Dinamika izražaja VANGL2 (**c**) prikazana je korištenjem linearnog i nelinearnog regresijskog modeliranja postotka područja kroz razvojne faze fetalnog bubrežnog tkiva CTRL-a. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

4.5. Izražaj proteina VANGL2 u različitim CAKUT fenotipovima

Kako bismo procijenili ima li razlike u izražaju VANGL2 u uzorcima kontrolne skupine (CTRL) i uzorcima zahvaćenim CAKUT-om, analizirali smo njegov obrazac bojenja. Utvrdili smo da su u DK i HK uzorcima obrasci bojenja VANGL2 bili slični u pogledu lokalizacije i intenziteta (**Slika 16a**). Rezultati su pokazali niže razine izražaja VANGL2 u HYP uzorcima, što je vidljivo kao difuzni zeleni signal uglavnom unutar glomerula i okolnog vezivnog tkiva (**Slika 16b**), dok je VANGL2 pokazao višu razinu izražaja u DYS uzorcima, gdje je opažen kao točkasti zeleni signal, uglavnom u displastičnim tubulima (dt) (**Slika 16c**).

Prilikom usporedbe postotka površine izražaja između kontrolne skupine (CTRL) i uzoraka s CAKUT-om, rezultati su pokazali da su DK i HK imali slične obrasce izražaja kao CTRL, bez značajnih razlika. Međutim, u HYP i DYS uzorcima uočena je značajna razlika ($p < 0,5$, **Slika 16d**).



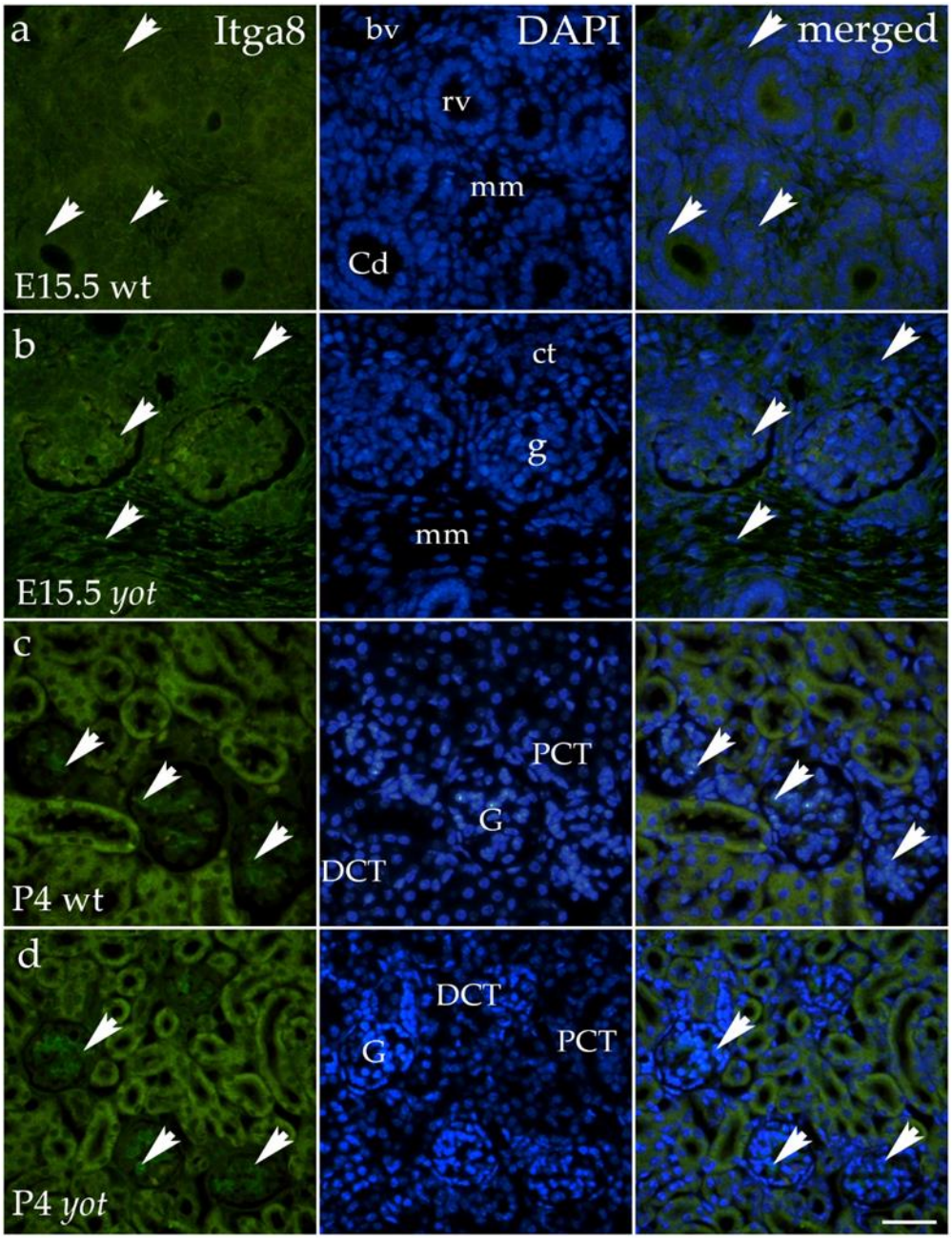
Slika 16. Prikaz imunofluorescencijskog bojenja ljudskih fetalnih bubrega korištenjem protutijela specifičnim za Van Gogh-like 2 (VANGL2) (**a**–**c**). Strelice prikazuju izražaj VANGL2

u glomerulima (g), proksimalnim zavijenim tubulima (pct), distalnim zavijenim tubulima (dct) i displastičnim tubulima (dt), kako je prikazano uz pomoć bojenja 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Prikazane su slike imunoekspresije VANGL2 i DAPI bojenja te preklopljene slike VANGL2 i DAPI u potkovastim bubrezima (HK) u 30.–31. razvojnom tjednu (dw) (**a**), hipoplastičnom bubregu (HYP) u 37. razvojnom tjednu (**b**) i displastičnom bubregu (DYS) u 38. razvojnom tjednu (**c**). Sve slike su snimljene pri povećanju od 40×, a mjerna trakica (engl. *scale bar*) na svim slikama je 100 μm. Postotak područja VANGL2-pozitivnih stanica u fetalnim bubrežnim tkivima DK, HK, HYP i DYS (**d**). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (okomita crta) i analizirani korištenjem ANOVA testa s jednim faktorom, praćeni Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Značajne razlike su označene sa * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$. U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je najmanje deset reprezentativnih slika.

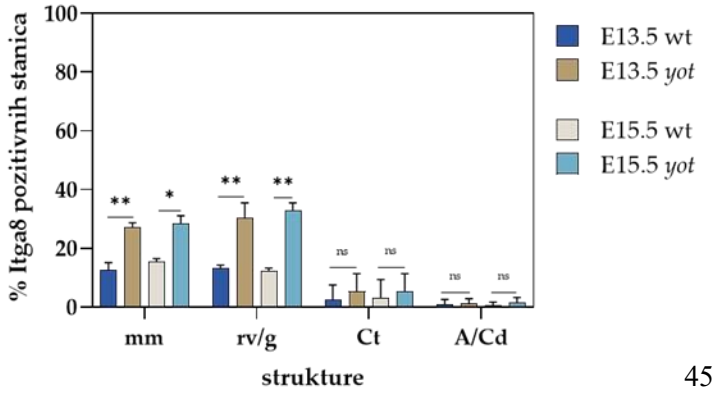
4.6. Izražaj proteina Itga8 u embrionalnim i postnatalnim uzorcima bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*)

Prostorno-vremenski izražaj proteina Itga8 u embrionalnim uzorcima bubrega miševa wt i *yot* prikazan je difuznim zelenim signalom. Najizraženiji je u nediferenciranim stanicama metanefrogenog mezoderma (mm) i nezrelim glomerulima (g), dok je slabiji izražaj uočen u zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim kanalićima (Cd) (**Slika 17a-b**). Postotak Itga8-pozitivnih stanica značajno se razlikovao između E13.5 i E15.5 u wt i *yot* miševa, a u strukturama: metanefrogeni mezoderm (mm) i nezreli glomeruli (g) zabilježen je viši postotak Itga8-pozitivnih stanica u *yot* miševa u odnosu na wt miševe (**Slika 17e**).

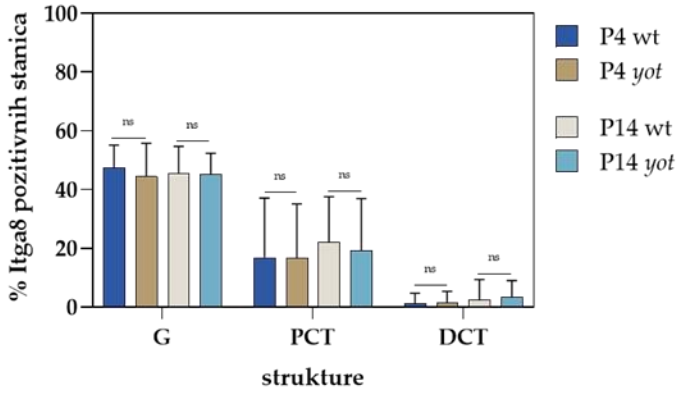
U postnatalnim uzorcima bubrega miševa wt i *yot*, difuzni zeleni signal proteina Itga8 također je bio prisutan. Najizraženiji je u stanicama glomerula (G) i proksimalno zavijenim kanalićima (PCT), dok je slabiji izražaj zabilježen u distalno zavijenim kanalićima (DCT) (**Slika 17c-d**). Postotak Itga8-pozitivnih stanica nije se značajno razlikovao između P4 i P14 u wt i *yot* miševa te nije uočena statistički značajna razlika u strukturama (**Slika 17f**).


a
Itga8
bv
DAPI
merged
rv
mm
Cd
E15.5 wt
b
ct
g
mm
E15.5 yot
c
PCT
G
DCT
P4 wt
d
DCT
G
PCT
P4 yot

e


% Itga8 pozitivnih stanica
100
80
60
40
20
0
**
*
**
**
ns
ns
ns
ns
mm
rv/g
Ct
A/Cd
strukture
E13.5 wt
E13.5 yot
E15.5 wt
E15.5 yot

f


% Itga8 pozitivnih stanica
100
80
60
40
20
0
ns
ns
ns
ns
ns
ns
G
PCT
DCT
strukture
P4 wt
P4 yot
P14 wt
P14 yot

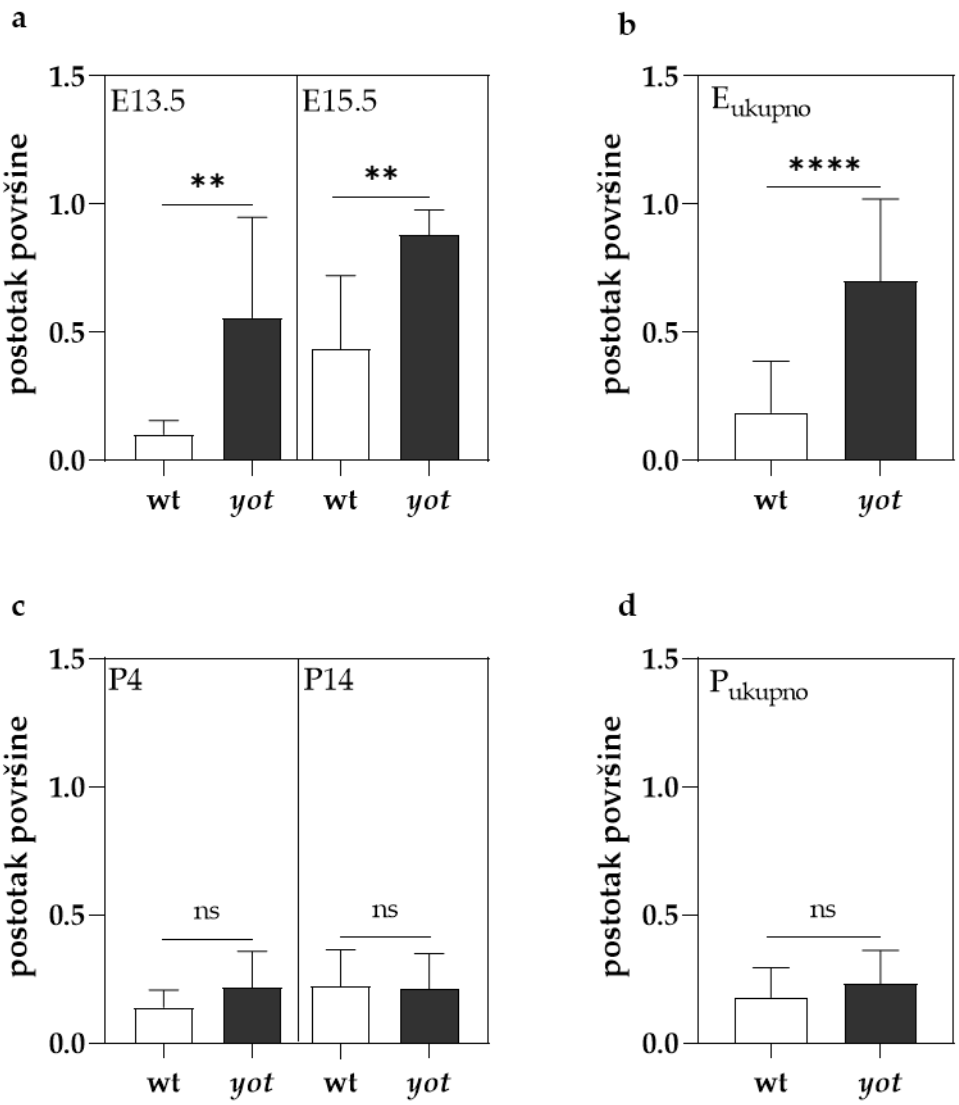
Slika 17. Prikaz imunofluorescencijskog bojenja embrionalnih i postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) miševa korištenjem protutijela specifičnim za alfa-8 integrin (Itga8) (**a–d**). Strelice prikazuju izražaj Itga8 u metanefrogenom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv)/nezrelim glomerulima (g), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A)/sabirnim kanalićima (Cd) u embrionalnim uzorcima (E) wt miševa i *yot* miševa (**a-b**), te u glomerulima (G), proksimalnim (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega (P) (**c-d**), kako je prikazano uz pomoć bojenja 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Prikazane su slike imunoekspresije Itga8 i DAPI bojenja, te preklopljene slike Itga8 i DAPI bubrega wt i *yot* miševa u embrionalnim danima 15.5 (E15.5) te postnatalnim danima (P4). Sve slike su snimljene pri povećanju od 40×, a mjerna trakica (engl. *scale bar*) na svim slikama je 100 μm. Raspodjela postotaka Itga8-pozitivnih stanica analizirana je u metanefrogenom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv)/nezrelim glomerulima (g), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A) i sabirnim kanalićima (Cd) u bubrezima divljih i *yotari* miševa u embrionalnim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) (e), te raspodjela postotaka Itga8-pozitivnih stanica analizirana je u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) bubrega miševa divljeg tipa i *yotari* miševa u postnatalnim danima 4 (P4) i 14 (P14) (f). Prikazani su podatci kao srednje vrijednosti ± SD (standardna devijacija) i analizirani dvosmjernom ANOVA metodom s Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Izražaj proteina Itga8 značajno je veći u oba embrionalna razdoblja (E13.5 i E15.5) (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, **Slika 18a**) u bubrezima *yot* miševa u usporedbi s wt miševima. Isto tako, vidiljivo je kako se izražaj proteina Itga8 povećava s embrionalnim starenjem *yot* i wt miševa pa je tako izražaj proteina Itga8 u bubrezima veći u E15.5. nego u E13.5.

Ukupan izražaj proteina Itga8 u bubrezima tijekom embrionalnog razdoblja jasno pokazuje vidljivo kako je njegova razina značajno viša u *yot* miševa u usporedbi s wt miševima, što sugerira kako mutacija u *yot* miševima utječe na izražaj ovog proteina u bubrezima tijekom embrionalnog razdoblja (**Slika 18b**).

Izražaj proteina Itga8 u bubrezima tijekom oba postnatalna razdbolja (P4 i P14) ostaje stalan, bez statistički značajne razlike između *yot* i wt (**Slika 18c**).

Ukupan izražaj proteina Itga8 tijekom postnatalnog razdoblja pokazuje kako nema promjena između ove dvije skupine miševa, što sugerira kako mutacija u *yot* miševima ne utječe na izražaj ovog proteina u bubrezima nakon rođenja (**Slika 18d**).

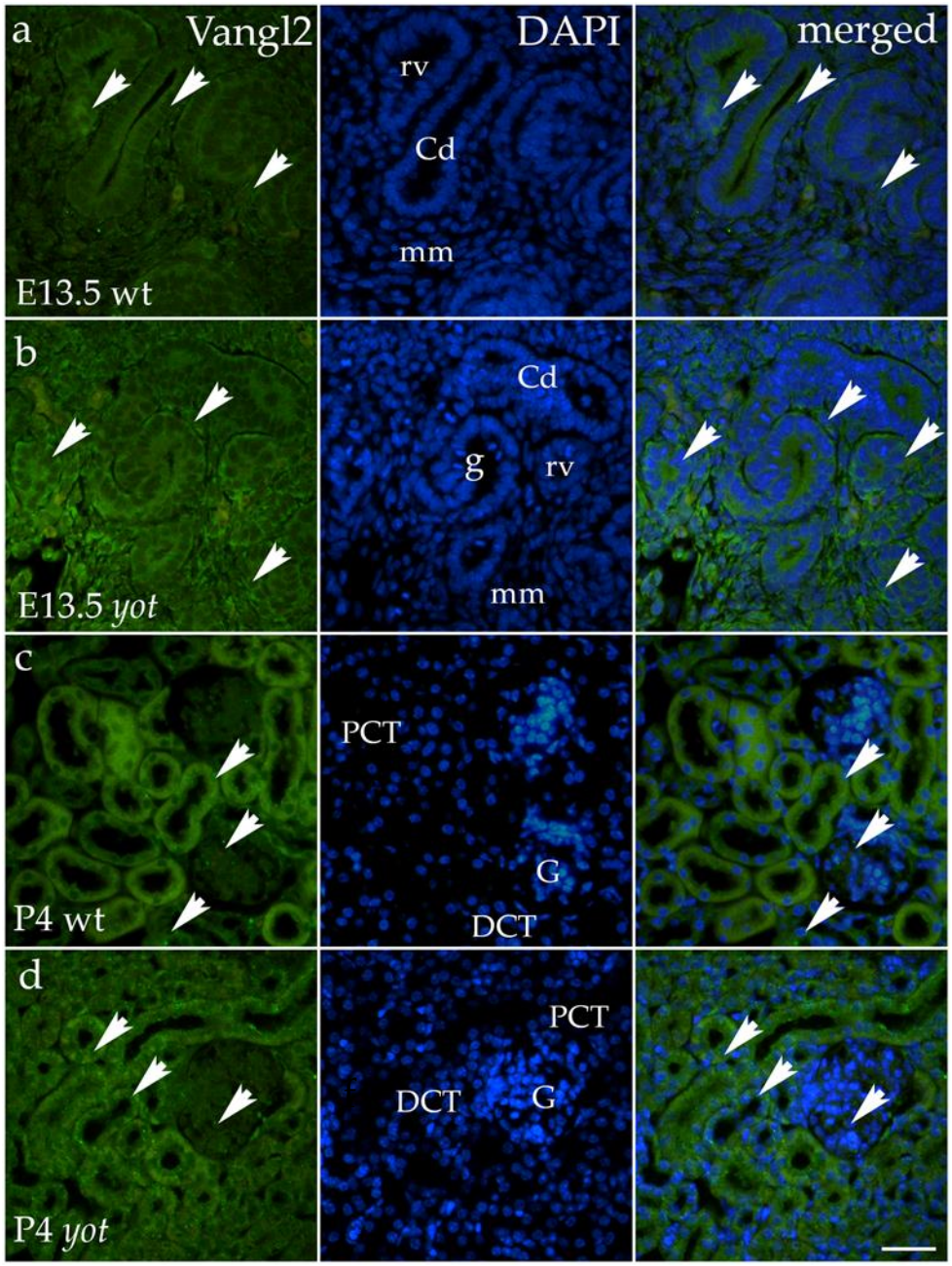


Slika 18. Postotak površine prekrivene Itga8-pozitivnim signalom u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) u embrionalnim danima E13.5 i E15.5 (**a, b**) i postnatalnim danima P4 i P14 (**c, d**). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (okomita crta) i analizirani korištenjem ANOVA testa s jednim faktorom, praćeni Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Značajne razlike su označene sa ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je najmanje deset reprezentativnih slika.

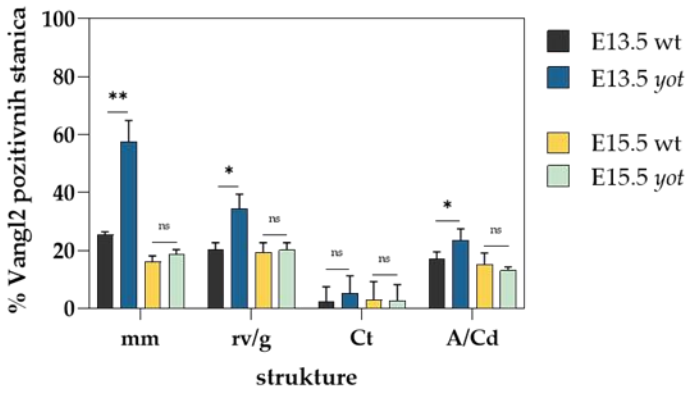
4.7. Izražaj proteina Vangl2 u embrionalnim i postnatalnim uzorcima bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*)

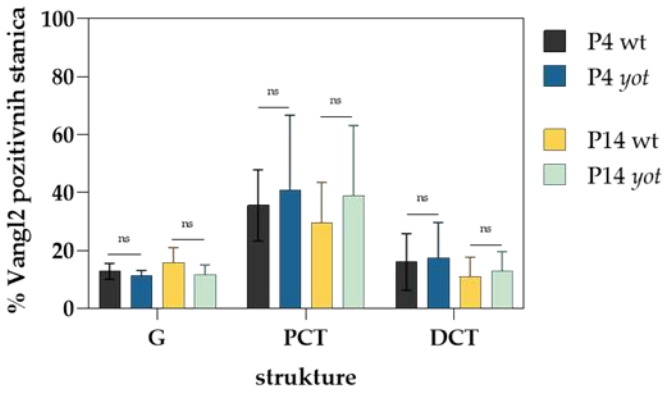
Prostorno-vremenski izražaj proteina Vangl2 u embrionalnim uzorcima bubrega miševa wt i *yot* prikazan je difuznim zelenim signalom. Najizraženiji je u nediferenciranim stanicama metanefrogenog mezoderma (mm), bubrežnim mjehurićima (rv)/nezrelim glomerulima (g), ampulama (A)/sabirnim kanalićima (Cd), dok je slabiji izražaj uočen u zavijenim kanalićima (Ct) (**Slika 19a-b**). Postotak Vangl2-pozitivnih stanica značajno se razlikovao između E13.5 i E15.5 u wt i *yot* miševa, a u strukturama: metanefrogeni mezenhim (mm), bubrežni mjehurić (rv)/nezreli glomerul (g) i ampula (A)/odvodni kanalić (Cd) zabilježen u E13.5 je viši postotak Itga8-pozitivnih stanica u *yot* miševa u odnosu na wt miševa (**Slika 19e**).

U postnatalnim uzorcima bubrega miševa wt i *yot*, difuzni zeleni signal proteina Vangl2 također je bio prisutan. Najizraženiji je u stanicama proksimalno zavijenih kanalića (PCT), dok je slabiji izražaj zabilježen u stanicama glomerula (G) i distalno zavijenih kanalića (DCT) (**Slika 19c-d**). Postotak Vangl2-pozitivnih stanica nije se značajno razlikovao između P4 i P14 u wt i *yot* miševa te nije uočena statistički značajna razlika u strukturama (**Slika 19f**).


a
Vangl2
DAPI
merged
rv
Cd
mm
E13.5 wt
b
Cd
g
rv
mm
E13.5 yot
c
PCT
G
DCT
P4 wt
d
PCT
DCT
G
P4 yot

e


% Vangl2 pozitivnih stanica
100
80
60
40
20
0
**
*
*
ns
mm
rv/g
Ct
A/Cd
strukture
E13.5 wt
E13.5 yot
E15.5 wt
E15.5 yot


% Vangl2 pozitivnih stanica
100
80
60
40
20
0
ns
G
PCT
DCT
strukture
P4 wt
P4 yot
P14 wt
P14 yot

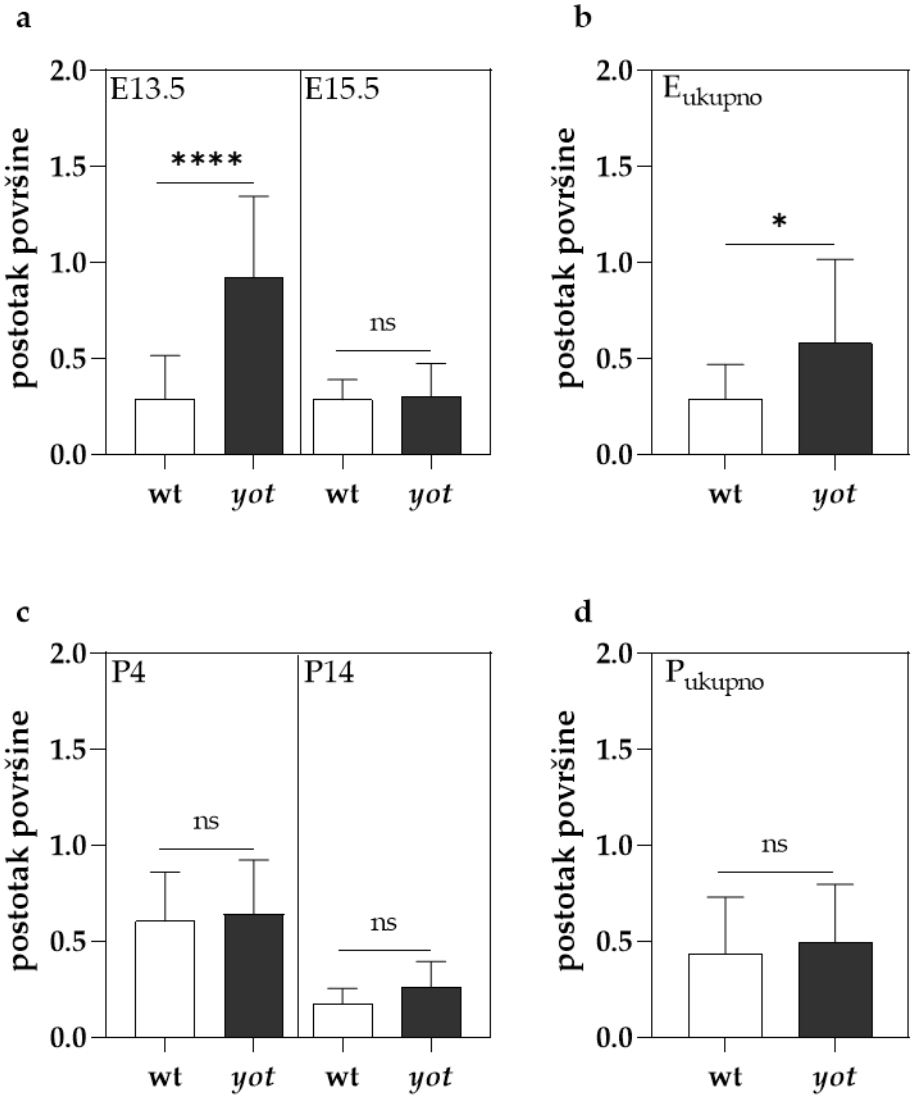
Slika 19. Prikaz imunofluorescencijskog bojenja embrionalnih i postnatalnih bubrega miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) miševa korištenjem protutijela specifičnim za Van Gogh-like 2 (Vangl2) (**a–d**). Strelice prikazuju izražaj Vangl2 u metanefrogenom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv)/nezrelim glomerulima (g), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A)/sabirnim kanalićima (Cd) u embrionalnim uzorcima (E) wt miševa i *yot* miševa (a-b), te u glomerulima (G), proksimalnim (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) postnatalnih bubrega (P) **(c-d**), kako je prikazano uz pomoć bojenja 4′,6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Prikazane su slike imunoekspresije Vangl2 i DAPI bojenja, te preklopljene slike Vangl2 i DAPI bubrega wt i *yot* miševa u embrionalnim danima 13.5 (E13.5) te postnatalnim danima (P4). Sve slike su snimljene pri povećanju od 40×, a mjerna trakica (engl. *scale bar*) na svim slikama je 100 μm. Raspodjela postotaka Vangl2-pozitivnih stanica analizirana je u metanefrogenom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv)/nezrelim glomerulima (g), zavijenim kanalićima (Ct), ampulama (A)/sabirnim kanalićima (Cd) u bubrezima wt i *yot* miševa u embrionalnim danima 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) (e), te raspodjela postotaka Vangl2 pozitivnih stanica analizirana je u glomerulima (G), proksimalnim zavijenim kanalićima (PCT) i distalnim zavijenim kanalićima (DCT) bubrega miševa wt i *yot* miševa u postnatalnim danima 4 (P4) i 14 (P14) (f). Prikazani su podatci kao srednje vrijednosti ± SD (standardna devijacija) i analizirani dvosmjernom ANOVA metodom s Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe.

Izražaj proteina Vangl2 značajno je povišen u bubrezima *yot* miševa u usporedbi s wt u E13.5 embrionalnom razdbolju, dok u E15.5 embrionalnom razdoblju izražaj ostaje nepromijenjen (**** $p < 0.0001$, **Slika 20a**).

Ukupan izražaj proteina Vangl2 u bubrezima tijekom embrionalnog razvoja jasno pokazuje da je razina značajno viša u *yot* miševa u usporedbi s wt miševima, što sugerira da uklanjanje gena *Dab1* u *yot* miševa može utjecati na izražaj ovog proteina tijekom embrionalnog razvoja u bubrezima (* $p < 0.05$, **Slika 20b**).

S druge strane, tijekom postnatalnih razdoblja (P4 i P14), izražaj proteina Vangl2 u bubrezima ostaje stabilan, bez statistički značajnih razlika između *yot* i wt miševa (**Slika 20c**).

Ovi rezultati ukazuju na to da uklanjanje gena *Dab1* u *yot* miševa ne mijenja izražaj proteina Vangl2 u bubrezima nakon rođenja, jer je ukupni izražaj proteina tijekom postnatalnog razdoblja nepromijenjen između ove dvije skupine (**Slika 20d**).



Slika 20. Postotak površine prekrivene Vangl2-pozitivnim signalom u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) u embrionalnim danima E13.5 i E15.5 (**a, b**) i postnatalnim danima P4 i P14 (**c, d**). Podatci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD (okomita crta) i analizirani korištenjem ANOVA testa s jednim faktorom, praćeni Tukeyjevim testom za višestruke usporedbe. Značajne razlike su označene sa * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je najmanje deset reprezentativnih slika.

4.8. Izražaj gena *ITGA8* i *VANGL2* iz *GSE83946 i* GSE85976 baza podataka

Izražaji gena *ITGA8* i *VANGL2* analizirani su u uzorcima tkiva mokraćovoda iz 19 pacijenata s CAKUT-om i 7 zdravih donora bubrega (GSE83946), kao i u uzorcima bubrežnog epitelijalnog tkiva (mIMCD3 stanice) iz miševa s HNF-1β mutacijom povezanim s CAKUT-om i zdravih kontrola (GSE85976) (137).

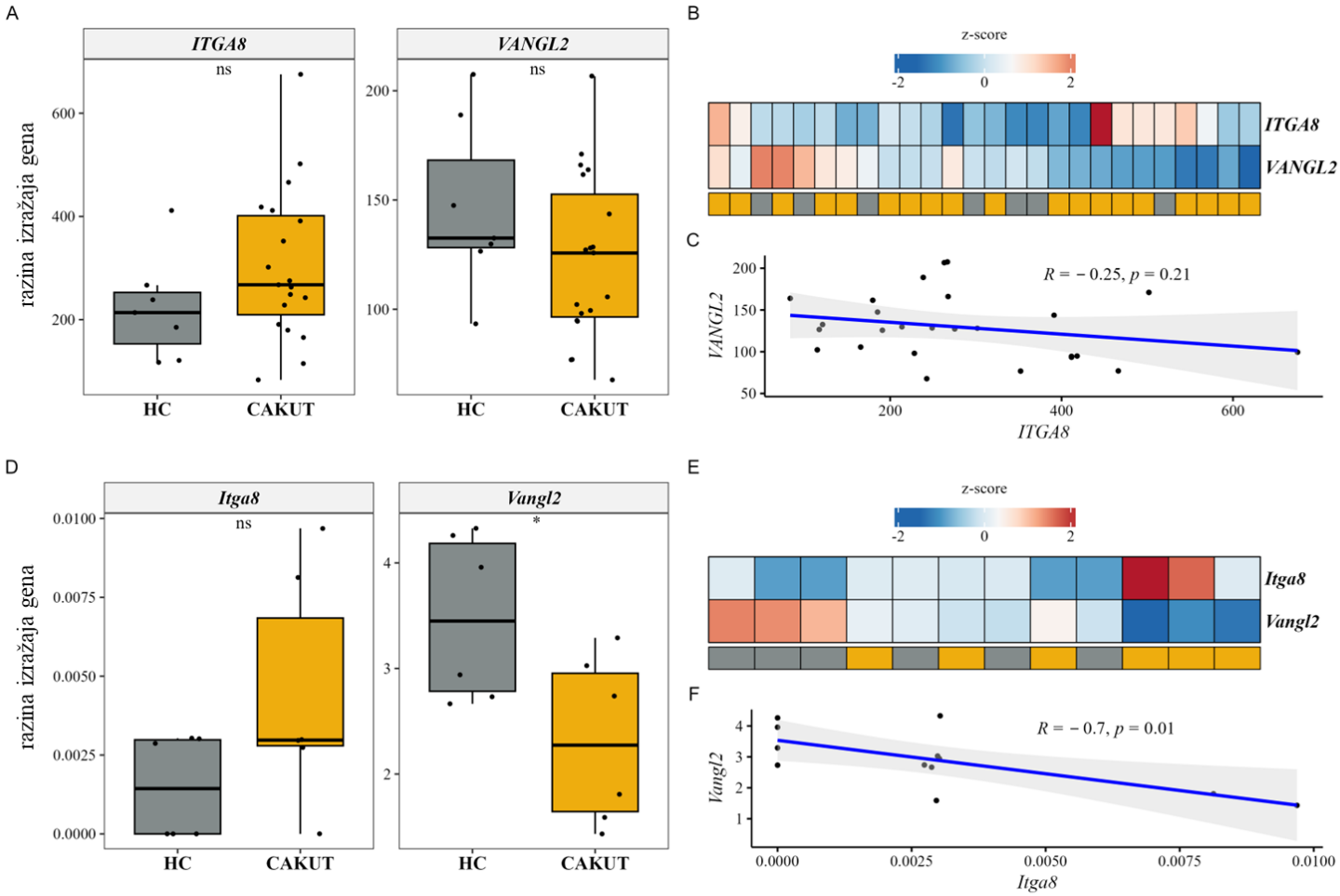
Ljudski uzorci:

Dijagram okvira s ručicama za izražaj gena *ITGA8* pokazuje uzlazni trend u uzorcima CAKUT-a u usporedbi s kontrolama, no statistička značajnost nije postignuta (**Slika 21A**). Slično tome, dijagram okvira s ručicama za gen *VANGL2* ukazuje na viši izražaj u kontrolama, ali također bez statističke značajnosti (**Slika 21A**). Toplinska karta (engl. *heatmap*) ne pokazuje jasnu razliku u izražaju gena između skupina CAKUT-a i kontrola za oba gena (**Slika 21B**). Korelacijska analiza između gena *ITGA8* i *VANGL2* ukazuje na negativan trend koji nije bio statistički značajan (**Slika 21C**).

Mišji uzorci:

Trendovi su bili usklađeni s podatcima za ljude. Dijagram okvira s ručicama za gen *Itga8* pokazuje povećan izražaj u uzorcima CAKUT-a, no razlika nije bila statistički značajna (**Slika 21D**). Suprotno tome, izražaj gena *Vangl2* bio je viši u kontrolnim uzorcima, pri čemu je postignuta statistička značajnost (**Slika 21D**). Toplinska karta ponovno ne pokazuje jasnu razliku u grupiranju uzoraka CAKUT-a i kontrola, iako postoji skroman pokazatelj za gen *Vangl2* (**Slika 21E**). Korelacijska analiza između gena *Itga8* i *Vangl2* u miševa otkriva statistički značajan negativan koeficijent korelacije (**Slika 21F**).

Ovi rezultati ističu specifične uzorke izražaja gena i korelacije povezane s patologijom CAKUT-a između vrsta, naglašavajući zajedničke i različite trendove u ljudi i miševa.



Slika 21. Usporedba izražaja gena *ITGA8* i *VANGL2* između CAKUT-a i skupine zdravih kontrola (HC) u ljudi i miševa. Prikaz uključuje dijagrame okvira s ručicama (**A, D**), toplinske karte (engl. *heatmap*) (**B, E**) te korelacijske grafikone (**C, F**), koji ilustriraju razlike u razinama izražaja gena *ITGA8* i *VANGL2* između uzoraka CAKUT-a i HC skupina. Normalizirane razine izražaja gena analizirane su t-testom za usporedbu skupina i Pearsonovom korelacijom za procjenu odnosa. Vizualizacije naglašavaju specifične uzorke izražaja gena kod obje vrste povezane s patologijom CAKUT-a.

5. RASPRAVA

5.1. Izražaj proteina ITGA8 i VANGL2 u zdravim, normalnim bubrezima i bubrezima zahvaćenim urođenim anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT)

Etiologija CAKUT-a, kako sindromskog, tako i nesindromskog, povezana je s više od 40 kromosomskih abnormalnosti i preko 50 gena (138). U ovom istraživanju utvrdili smo da su izražaji ITGA8 i VANGL2 promijenjeni u uvjetima CAKUT-a. Također smo pokazali da se izražaj ITGA8 mijenja tijekom fetalnog starenja, dok izražaj VANGL2 ostaje konstantan. Nadalje, ITGA8 se izražava na nižim razinama u bubrezima s udvostručenim ureterom (DK) i displastičnim bubrezima (DYS) u usporedbi s normalnim zdravim bubrezima (CTRL), dok se VANGL2 izražava na nižim razinama u hipoplastičnim bubrezima (HYP) i na visokim razinama u displastičnim bubrezima (DYS). Ovi nalazi predlažu da bi ITGA8 i VANGL2 mogli biti obećavajući prognostički markeri za CAKUT.

ITGA8, dio porodice receptora za staničnu adheziju (integrini), ključan je za razvoj bubrega u ljudi. ITGA8 kodira podjedinicu integrina α8, površinski stanični protein koji se uglavnom izražava u mezenhimalnim stanicama, poput mezangijskih stanica bubrega, fibroblasta te vaskularnih i visceralnih glatkih mišićnih stanica (139,140). Podjedinica integrina α8 ključna je za pravilan razvoj bubrega jer kontrolira mezenhimalno-epitelni prijelaz tijekom nefrogeneze (141). Disregulacija izražaja ili funkcije ITGA8 može utjecati na bubrežnu fibrozu i urođene anomalije bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT) (120). Linton i suradnici pokazali su da izostanak ITGA8 dovodi do bubrežne agenezije te da je nefropektin, ključan čimbenik u razvoju bubrega, esencijalni ligand za ITGA8 tijekom početnih faza razvoja bubrega (142). Također su utvrdili da ITGA8 i njegov ligand nefropektin sudjeluju u putu koji regulira izražaj Gdnf-a, ključnog čimbenika rasta.

Naši rezultati pokazali su smanjenje izražaja ITGA8 u DK i DYS, što bi moglo utjecati na normalan epitelno-mezenhimalni prijelaz (EMT) i dovesti do razvoja CAKUT-a. Ovi rezultati u skladu su s prethodnim studijama koje pokazuju da defekti u ITGA8 mogu rezultirati kongenitalnim anomalijama bubrega i mokraćnog sustava (CAKUT) te da miševi koji nemaju ITGA8 imaju smanjene bubrege ili čak ageneziju bubrega (120). Također smo pokazali da se izražaj ITGA8 smanjuje tijekom normalnog razvoja zdravih bubrega, što je očekivano s obzirom na to da ITGA8 ima ulogu u ranoj fazi razvoja bubrega (posebno tijekom EMT-a). Prethodne studije pokazale su da proširenje kliničkog i genotipskog spektra abnormalnosti ITGA8 otkriva

visok i neočekivan stupanj fenotipske heterogenosti u autosomno recesivnim bolestima (140). Budući da se izražaj ITGA8 razlikovao u bubrezima zahvaćenim CAKUT-om, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se istražili molekularni mehanizmi koji stoje iza tog diferencijalnog izražaja. Osim toga, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ispitala moguća terapijska primjena ciljanja ITGA8 u kontekstu abnormalnosti CAKUT-a.

VANGL2 igra ključnu ulogu u uspostavljanju i održavanju planarno stanične polarizacije (PCP), konzerviranog mehanizma koji je nužan za organizaciju tkiva i morfogenezu (128). Izvješteno je da tijekom embrionalnog razdoblja VANGL2 kontrolira tubulogenezu bubrega reguliranjem konvergentne ekstenzije (CE) i apikalne konstrikcije (AC), iako poremećaji u PCP signalizaciji mogu dovesti do fenotipa CAKUT-a, gubitak VANGL2 ne narušava zrelu bubrežnu arhitekturu (143). Mutacije u genima PCP-a mogu rezultirati displastičnim bubrezima, uz druge abnormalnosti više organa (144). Abnormalnosti neuralne cijevi povezane su s mutacijama koje dovode do gubitka funkcije gena VANGL2 kod ljudi, što naglašava važnost tih gena u razvojnim procesima (145). Prema Papakrivopoulou i suradnicima, prekomjerno izražavanje i utišavanje VANGL2 u ksenopusima rezultira značajnim savijanjem ili skraćivanjem tjelesne osi te abnormalnim zatvaranjem neuralne cijevi (146). Naši podatci pokazuju da se izražaj VANGL2 ne mijenja tijekom razvoja zdravih bubrega, dok se izražaj VANGL2 mijenja kod hipoplazije i displazije bubrega, što je u skladu s prethodnim nalazima. Naime, Babyeva i suradnici uočili su displaziju bubrega kod embrionalnih bubrega mutanta Lp (modela s mutacijom u genu *VANGL2,* poznatom po uzrokovanju razvojnih abnormalnosti) (142), dok je Derish i suradnici (16) primijetili da embrionalni *Vangl2*$^{\Delta/\Delta}$ bubrezi pokazuju hipoplaziju. Pokazalo se da agresivni tumori bazalnog tipa imaju visoke razine izražaja VANGL2, što je povezano s lošom prognozom (147). Brzóska i suradnici (148) pokazali su da je interakcija između Celsr1 i VANGL2 u rastu ureteričkog stabla u kaudalnom dijelu razvojnog bubrega nužna za maturaciju glomerula. Daljnje istraživanje proteina VANGL2 moglo bi potencijalno dovesti do razvoja ciljanih terapija za abnormalnosti CAKUT-a.

Naša studija ima određena ograničenja koja treba uzeti u obzir. Primarno ograničenje naše studije leži u malom broju uzoraka za svaku vrstu CAKUT-a te u promatračkom dizajnu. Promatrani uzorci uključuju arhivirani ljudski fetalni materijal koji je bio fiksiran formalinom i ugrađen u parafin, pa stoga nismo mogli koristiti tehnike poput protočne citometrije ili Western

blottinga za kvantitativnu analizu proteinskog izražaja. Također, nedostatak uzoraka iz faze 1 fetalnog razvoja bubrega ograničava analizu i potencijalne zaključke koje možemo izvući.

5.2. Izražaj proteina Itga8 i Vangl2 u bubrezima miševa divljeg tipa (wt) i *yotari* (*yot*) miševa

Integrini reguliraju osnovne stanične procese, uključujući preživljavanje i migraciju, te su ključni za razvoj tkiva i napredovanje bolesti (149). Među njima, Itga8, koji kodira alfa8β1 integrinsku podjedinicu, igra važnu ulogu u tumorogenezi i razvoju organa. U raku, niski izražaj *Itga8* povezan je s lošijom prognozom kod bubrežnog karcinoma, dok visoki izražaj potiče migraciju i invaziju u multiplom mijelomu (150–152). Osim toga, Itga8 je od ključne važnosti za razvoj bubrega, jer olakšava interakciju između epitela mokraćovodnog pupoljka i metanefričkog mezenhima, potičući grananje mokraćovodnog pupoljka i diferencijaciju nefrona putem vezanja za nefronektin. Naši nalazi potvrđuju ključnu ulogu Itga8 u razvoju bubrega, podržavajući prethodne studije koje su pokazale njegovu povezanost s tim ključnim procesima. Konkretno, mutacije u genu *Dab1* dovode do značajnog poremećaja u izražaja Itga8, što odražava nedostatke u ranijim studijama o ageneziji bubrega i smanjenju broja nefrona (121, 123, 141, 142).

U našoj studiji primijetili smo da je izražaj Itga8 bio značajno veći u *yotari* (*yot*) miševa u odnosu na kontrolne (wt) miševe u embrionalnim stadijima (E13.5 i E15.5). Ovaj povećani izražaj sugerira da mutacija gena *Dab1* ima učinak u ranoj fazi na izražaj Itga8, ističući njegov utjecaj na razvoj bubrega. Osim toga, *Itga8* se povezuje s Fraserovim proteinskim kompleksom (FPC) u epitelno-mezenhimskim interakcijama koje su kritične za morfogenezu tkiva. Samostalne mutacije *Fras1* i *Itga8* pokazuju slične razvojne defekte, uključujući ageneziju bubrega i probleme u adheziji epitelno-mezenhimskih stanica, sugerirajući funkcionalnu povezanost između ovih gena. Vezivanje Itga8 za Frem1, komponentu FPC-a, i nefronektin (Npnt), dodatno potvrđuje njegovu ključnu ulogu u povezivanju FPC-a s pravilnim razvojem bubrega (142, 153).

Nadalje, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se istražio terapeutski potencijal ciljanog djelovanja na Itga8 u abnormalnostima CAKUT-a. Modifikacija izražaja ili funkcije Itga8 mogla bi pružiti nove pristupe za liječenje urođenih bubrežnih poremećaja.

Planarna polarnost stanica (PCP) je ključan razvojni proces koji regulira polarizaciju stanica unutar ravnine epitelnih tkiva, igrajući ključnu ulogu u morfogenezi tkiva i embrionalnom

razvoju (154, 155). Van Gogh-like 2 (Vangl2) je ključan za embrionalni razvoj, osobito tijekom zatvaranja neuralne cijevi, te je ključna komponenta visoko konzerviranog PCP signalizacijskog puta koji upravlja formiranjem polariziranih struktura u metazoama. Vangl2 se dinamički redistribuira tijekom razvoja duktularnih tkiva, a ta redistribucija je ključna za uspostavu normalne funkcije tkiva (156, 157). Vangl2 igra značajnu ulogu u razvoju bubrega, osobito tijekom embrionalnog razdoblja, regulirajući stanične pokrete kao što su konvergentna ekstenzija (CE) i apikalna kontrakcija (AC), koji su ključni za renalnu tubulogenezu (16, 158, 159).

Naši rezultati pokazuju značajan porast izražaja Vangl2 u E13.5 embrionalnim uzorcima *yotari* (*yot*) miševa u odnosu na kontrolne (wt) miševe, što sugerira da mutacija gena *Dab1* ima učinak u ranoj fazi na izražaj proteina Vangl2. Ovaj rezultat je u skladu s istraživanjima koja naglašavaju važnost PCP signaliziranja u ranim fazama razvoja, gdje Vangl2 igra ulogu u morfogenezi bubrega (159). Međutim, do E15.5 embrionalnog dana razvoja, razine izražaja Vangl2 u *yotari* miševa vratile su se na slične razine kao u kontrolnim miševima, što ukazuje da su učinci gubitka gena *Dab1* na izražaj Vangl2 specifični za stadij. Ova vremenska regulacija PCP komponenata tijekom razvoja bubrega u skladu je s nalazima Kunimoto et al. (2017) (158), koji su izvijestili da su učinci gubitka Vangl2 najistaknutiji tijekom ranih embrionalnih stadija, ali s vremenom opadaju, omogućujući kompenzacijske mehanizme koji reguliraju funkciju bubrega.

6. ZAKLJUČCI

- Analiza postotka površine ITGA8-pozitivnih stanica pokazala je da se izražaj proteina ITGA8 smanjuje s fetalnom dobi, dok je analiza postotka površine VANGL2-pozitivnih stanica pokazala kako je izražaj proteina VANGL2 stalan tijekom fetalnog razvoja zdravog, normalnog bubrega.
- Prostorno-vremensko bojenje ITGA8 otkriveno je kao difuzni zeleni signal, prisutan najviše u citoplazmi visceralnog sloja Bowmanove kapsule (g), proksimalnih zavijenih tubula (pct) i distalnih zavijenih tubula (dct).
- Prostorno-vremensko bojenje VANGL2 otkriveno otkriveno je kao difuzni zeleni signal, prisutan najviše u citoplazmi glomerula (g), proksimalnih zavijenih tubula (pct) i distalnih zavijenih tubula (dct).
- Izražaj ITGA8 je promijenjen u DK (bubreg s udvostručenim ureterom) i DYS (displastični bubreg), dok je izražaj VANGL2 promijenjen u HYP (hipoplastični bubreg) i DYS (displastični bubreg).
- Izražaj proteina Itga8 je značajno viši u *yotari* (*yot*) miševa nego u divljem tipu (wt) u embrionalnim fazama (E13.5 i E15.5), što ukazuje na mogući utjecaj mutacije gena *Dab1* na razvoj bubrega.
- Izražaj proteina Vangl2 značajno raste u *yotari* (*yot*) miševa u fazi E13.5, ali ne i u E15.5, sugerirajući učinke uklanjanja gena *Dab1* specifične za razvojnu fazu.
- Postnatalno (P4 i P14), razine proteina Itga8 i Vangl2 ostaju dosljedne između miševa *yotari* (*yot*) i divljih tipova (wt), naglašavajući njihovu ključnu ulogu u embrionalnom razvoju bubrega.
- Iz rezultata analize izražaja gena *ITGA8* i *VANGL2* iz baza podataka GSE83946 i GSE85976 u ljudskim i mišjim uzorcima s CAKUT-om, uočeni su trendovi u izražaju tih gena, no statistička značajnost nije postignuta, osim u izražaju gena *Vangl2* u kontrolnim miševima, gdje je postignuta statistička značajnost. Ovi rezultati ističu specifične obrasce izražaja gena i korelacije u patologiji CAKUT-a među različitim vrstama, naglašavajući slične i različite trendove u ljudima i miševima.

Naša otkrića imaju značaj jer ukazuju na promjene u izražaju proteina ITGA8 i VANGL2 tijekom normalnog razvoja ljudskog i mišjeg bubrega, kao i kod bubrežnih poremećaja. Potrebna su daljnja opservacijska istraživanja na ljudskim uzorcima, kao i eksperimentalna ispitivanja na

životinjskim modelima, kako bismo bolje razumjeli ulogu ovih proteina u normalnom razvoju bubrega te u kontekstu urođenih anomalija bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT).

Ova istraživanja su ključna za razjašnjavanje molekularnih mehanizama koji stoje iza razvoja bubrega i patogeneze bubrežnih bolesti, što bi moglo otvoriti put prema razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa. Poseban naglasak treba staviti na translacijska istraživanja koja bi omogućila primjenu ovih otkrića u kliničkoj praksi, s ciljem poboljšanja ishoda za pacijente s CAKUT-om i drugim srodnim anomalijama.

7. SAŽETAK

NASLOV DOKTORSKOG RADA: ITGA8 I VANGL2 KAO PROGNOSTIČKI MARKERI UROĐENIH ANOMALIJA BUBREGA I MOKRAĆNOG TRAKTA U ČOVJEKA I MIŠA

UVOD: Urođene anomalije bubrega i mokraćnog trakta (CAKUT) čine skup strukturnih i funkcionalnih anomalija koje nastaju tijekom razvoja bubrega i mokraćnog trakta u embrionalnom razdoblju. S učestalošću od jednog slučaja na 500 novorođenčadi, ove anomalije spadaju među najčešće urođene poremećaje. CAKUT uključuje širok raspon nepravilnosti koje se mogu pojaviti izolirano ili kao dio sindromskih poremećaja, često dovodeći do teških oštećenja bubrega i mokraćnog trakta. Unatoč ranoj dijagnozi, značaj CAKUT-a ne ograničava se samo na neonatalno razdoblje jer predstavlja vodeći uzrok kroničnog bubrežnog zatajenja u djece. Bubrežna displazija i hipoplazija odgovorne su za približno 20% ovih slučajeva, dok nasljedne bolesti poput policistične bolesti bubrega u odrasloj dobi uzrokuju 10% kroničnih zatajenja bubrega.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj ovog istraživanja je analizom imunofluorescencije utvrditi prostornu i vremensku raspodjelu proteina ITGA8 i VANGL2 u bubrezima zdravih, normalnih te CAKUT ljudskih fetalnih uzoraka. Također, istraživanje ima za cilj ispitati utjecaj utišavanja gena *Dab1* na izražaj proteina Itga8 i Vangl2 u embrionalnim i postnatalnim uzorcima miša.

MATERIJALI I METODE: U ovom istraživanju analizirani su obrasci izražaja kandidata gena za CAKUT, *integrina alfa-8* (*ITGA8*) i *Van Gogh-like 2* (*VANGL2*), primjenom imunohistokemije i imunofluorescencije u ljudskim fetalnim tkivima zdravih i CAKUT bubrega, kao i u modelu *yotari* (*yot*) miševa s mutacijom u genu *Dab1*.

REZULTATI: Rezultati su pokazali da izražaj Itga8 i Vangl2 varira pod uvjetima CAKUT-a te je značajno povišen u embrionalnim bubrezima *yotari* (*yot*) miševa u usporedbi s divljim tipom (wt), dok se u postnatalnim bubrezima nisu uočile značajne promjene. Prostorno, Itga8 je najizraženiji u metanefričkom mezodermu i bubrežnim vezikulama/nezrelim glomerulima, dok je Vangl2 pokazao izraženu prisutnost u metanefričkom mezodermu, vezikulama, nezrelim glomerulima te sabirnim kanalićima. Uz to, otkriveno je da u ljudskim uzorcima VANGL2 zadržava stalan izražaj tijekom fetalnog sazrijevanja, dok izražaj ITGA8 varira. U usporedbi sa zdravim bubrezima (CTRL), ITGA8 je slabije izražen u bubrezima s udvostručenim ureterom (DK) i displastičnim bubrezima (DYS), dok je VANGL2 značajno izražen u displastičnim (DYS), a slabije u hipoplastičnim bubrezima (HYP).

ZAKLJUČAK: Ovi rezultati predlažu da poremećaji izražaja ITGA8 i VANGL2, uzrokovani genetskim čimbenicima poput mutacije gena *Dab1*, pridonose razvojnim defektima bubrega povezanima s CAKUT fenotipovima. Identifikacija ovih proteina kao potencijalnih prognostičkih pokazatelja i terapijskih ciljeva za CAKUT otvara mogućnosti za daljnje istraživanje molekularnih mehanizama koji leže u pozadini diferencijalnog izražaja ITGA8 i VANGL2.

KLJUČNE RIJEČI: *CAKUT, urođene anomalije bubrega i mokraćnog trakta, ITGA8, VANGL2, bubreg*

8. SUMMARY

TITLE OF THE DOCTORAL DISSERTATION: ITGA8 AND VANGL2 AS PROGNOSTIC MARKERS OF CONGENITAL ANOMALIES OF THE KIDNEY AND URINARY TRACT IN A HUMAN AND A MOUSE

INTRODUCTION: Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) represent a group of structural and functional abnormalities that arise during the development of the kidneys and urinary tract in the embryonic period. With an incidence of one case per 500 newborns, these anomalies rank among the most common congenital disorders. CAKUT encompasses a broad spectrum of defects that can occur as isolated anomalies or as part of syndromic disorders, often leading to significant damage to the kidneys and urinary tract. Despite early diagnosis, the importance of CAKUT extends beyond the neonatal period, as it remains a leading cause of chronic kidney failure in children. Renal dysplasia and hypoplasia are responsible for approximately 20% of these cases, while hereditary diseases such as polycystic kidney disease account for 10% of chronic kidney failure in adults.

AIM OF THE STUDY: This study uses immunofluorescence analysis to determine the spatial and temporal distribution of ITGA8 and VANGL2 proteins in the kidneys of healthy, normal, and CAKUT human fetal samples. Additionally, it aims to investigate the impact of *Dab1* gene silencing on the expression of Itga8 and Vangl2 proteins in embryonic and postnatal mouse samples.

MATERIALS AND METHODS: In this study, we analyzed the expression patterns of CAKUT candidate genes, *integrin alpha-8* (*ITGA8*) and *Van Gogh-like 2* (*VANGL2*), using immunohistochemistry and immunofluorescence in human fetal tissues of healthy and CAKUT-affected kidneys, and in the *yotari* (*yot*) mouse model carrying a *Dab1* gene mutation.

RESULTS: The results showed that the expression of Itga8 and Vangl2 varies under CAKUT conditions and is significantly elevated in embryonic kidneys of *yotari* (*yot*) mice compared to wild-type (wt) mice. At the same time, no significant differences were observed in postnatal kidneys. Spatially, Itga8 exhibited the strongest expression in the metanephric mesenchyme and renal vesicles/immature glomeruli, whereas Vangl2 demonstrated pronounced expression in the metanephric mesenchyme, vesicles, immature glomeruli, and collecting ducts.

Additionally, VANGL2 maintained a constant expression in human samples during fetal maturation, while ITGA8 expression varied. Compared to healthy kidneys (CTRL), ITGA8 was poorly expressed in duplex kidneys (DK) and dysplastic kidneys (DYS). At the same time, VANGL2 showed significant expression in dysplastic kidneys (DYS) and lower expression in hypoplastic kidneys (HYP).

CONCLUSION: These findings suggest that disruptions in ITGA8 and VANGL2 expression, caused by genetic factors such as *Dab1* gene mutations, contribute to kidney developmental defects associated with CAKUT phenotypes. Identifying these proteins as potential prognostic markers and therapeutic targets for CAKUT opens opportunities for further research into the molecular mechanisms underlying the differential expression of ITGA8 and VANGL2.

KEYWORDS: *CAKUT, congenital anomalies of the kidney and urinary tract, ITGA8, VANGL2, kidney*

9. LITERATURA

1. Talati AN, Webster CM, Vora NL. Prenatal genetic considerations of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Prenat Diagn. 2019;39(9):679-692.

2. Chan K, Li X. Current epigenetic insights in kidney development. Genes. 2021;12(8):1281.

3. 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.

4. Kelam N, Racetin A, Polović M, Benzon B, Ogorevc M, Vukojević K, et al. Aberrations in FGFR1, FGFR2, and RIP5 Expression in Human Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT). Int J Mol Sci. 2022;23(24):15537.

5. Yosypiv I V. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: A genetic disorder? Int J Nephrol. 2012;909083(10):20.

6. Vieira M, Ferreira A, Nolasco F. Congenital kidney and urinary tract anomalies: a review for nephrologists. Port J Nephrol Hypert. 2018; 32(4): 362-368.

7. Kohl S, Habbig S, Weber LT, Liebau MC. Molecular causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Mol Cell Pediatr. 2021;8(1):2.

8. Kolvenbach CM, Shril S, Hildebrandt F. The genetics and pathogenesis of CAKUT. Nat Rev Nephrol. 2023;19:709–720.

9. Virth J, Mack HG, Colville D, Crockett E, Savige J. Ocular manifestations of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). Pediatr Nephrol. 2024;39(2):357-369.

10. Stonebrook E, Hoff M, Spencer JD. Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: a Clinical Review. Current Treatment Options in Pediatrics. 2019;5(3):223-35.

11. Connaughton DM, Hildebrandt F. Disease mechanisms of monogenic congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2022;190(3):325-43.

12. Nigam A, Knoers NVAM, Renkema KY. Impact of next generation sequencing on our understanding of CAKUT. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2019;91:104- 10.

13. Osathanondh V., Potter E. L. Development of Human Kidney as Shown by Microdissection. III. Formation and Interrelationship of Collecting Tubules and Nephrons. Arch Pathol. 1963;76:290-302.

14. Ogg CS. Book Review: Normal and Abnormal Development of the Kidney. Proc R Soc Med. 1973;66(10):1065-1065.

15. 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.

16. Derish I, Lee JKH, Wong-King-Cheong M, Babayeva S, Caplan J, Leung V, et al. Differential role of planar cell polarity gene Vangl2 in embryonic and adult mammalian kidneys. PLoS One. 2020;15(3):e0230586.

17. Westland R, Renkema KY, Knoers NVAM. Clinical integration of genome diagnostics for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Clin J Am Soc Nephrol. 2020;16(1):128-37.

18. Ichikawa I, Kuwayama F, Pope JC, Stephens FD, Miyazaki Y. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. Kidney Int. 2002;61(3):889-98.

19. Lange-Sperandio B, Anders HJ, Stehr M, Chevalier RL, Klaus R. Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: A Continuum of Care. Semin Nephrol. 2023;27:151433.

20. 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.

21. 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(2):130-40.

22. Elfenbein IB, Baluarte HJ, Gruskin AB. Renal hypoplasia with oligomeganephronia. Light, electron, fluorescent microscopic and quantitative studies. Arch Pathol Lab Med. 1974;97(3):143-9.

23. Arant BS, Sotelo-Avila C, Bernstein J. Segmental “hypoplasia” of the kidney (Ask-Upmark). J Pediatr. 1979;95(6):931-9.

24. Valderrama E, Berkman JI. The Ask-Upmark kidney in a premature infant. Clin Nephrol. 1979;11(6):313-7.

25. Shindo S, Bernstein J, Arant BS. Evolution of renal segmental atrophy (Ask-Upmark kidney) in children with vesicoureteric reflux: Radiographic and morphologic studies. J Pediatr. 1983;102(6):847-54.

26. Bonsib SM. Renal Hypoplasia, from Grossly Insufficient to Not Quite Enough: Consideration for Expanded Concepts Based upon the Author's Perspective with Historical Review. Adv Anat Pathol. 2020;27(5):311-30.

27. Cain JE, Di Giovanni V, Smeeton J, Rosenblum ND. Genetics of renal hypoplasia: Insights into the mechanisms controlling nephron endowment. Pediatr Res. 2010;68(2):91-8.

28. Lote CJ. Principles of Renal Physiology: Springer New York; 2012.

29. Ljungqvist A, Lagergren C. THE ASK-UPMARK KIDNEY: A Congenital Renal Anomaly Studied by Micro-Angiography and Histology. Acta Pathol Microbiol Scand. 1962;56(3):277-83.

30. Royer P, Habib R, Broyer M, Nouaille Y. Segmental hypoplasia of the kidney in children. Adv Nephrol Necker Hosp. 1971;1:145-59.

31. Sokhal AK, Singh BP, Sankhwar S, Saini DK. Ask-Upmark kidney with bilateral pelvi-ureteric junction obstruction – A rare entity. Afr J Urol. 2016;22(3):189–192.

32. Barajas L, Marks LS, Trygstad CW. Unilateral renal hypoplasia with associated venous anomaly and hypertension - A study of the juxtaglomerular cells. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1977;374(2):169-82.

33. Bonsib SM, Meng RL, Johnson FP. Ask-upmark kidney with contralateral renal artery fibromuscular dysplasia. Am J Nephrol. 1985;5(6):450-6.

34. Zezulka A V., Arkell DG, Beevers DG. The association of hypertension, the Ask-Upmark kidney and other congenital abnormalities. J Urol. 1986;135(5):1000-1.

35. Godard C, Vallotton MB, Broyer M. Plasma renin activity in segmental hypoplasia of the kidneys with hypertension. Nephron. 1973;11(5):308-17.

36. Ljungqvist A, Lagergren C. THE ASK-UPMARK KIDNEY: A Congenital Renal Anomaly Studied by Micro-Angiography and Histology. Acta Pathol Microbiol Scand. 1962;56(3):277-83.

37. Rifai K, Amjad M, Eljadi H, Elmoussaoui S, Belmejdoub G. Hypertension artérielle révélant un petit rein d'Ask-Upmark. Ann Endocrinol (Paris). 2014;75(5–6):471.

38. Habib R, Courtecuisse V, Mathieu H, Royer P. A peculiar anatomo-clinical type of chronic renal insufficiency in the child: bilateral congenital oligonephronic hypoplasia. J Urol Nephrol (Paris). 1962;68:139-43.

39. Royer P, Habib R, Mathieu H, Courtecuisse V. Congenital bilateral renal hyperplasia with reduction of the number and hypertrophy of the nephrons in children. Ann Pediatr (Paris). 1962;9:133-46.

40. Ng WL, Cheung MF, Chan CW, Yu CL. Oligomeganephronic renal hypoplasia. Pathology. 1980;12(4):639-45.

41. Jain S, Chen F. Developmental pathology of congenital kidney and urinary tract anomalies. Vol. 12, Clin Kidney J. 2018;12(3):382-399.

42. Fetterman GH, Habib R, Fabrizio NS, Studnicki FM. Congenital Bilateral Oligonephronic Renal Hypoplasia with Hypertrophy of Nephrons (Oligoméganéphronie): Studies by Microdissection . Am J Clin Pathol. 1969;52(2):199–207.

43. Griffel B, Pewzner S, Berandt M. Unilateral "Oligoméganéphronie" with agenesis of the contralateral kidney, studied by microdissection. Virchows Arch A Pathol Anat. 1972;357(3):179-86.

44. Emmett JL, Alverez Ierena JJ, Mcdonald JR. Atrophic pyelonephritis versus congenital renal hypoplasia. J Am Med Assoc. 1952;148(17):1470-7.

45. Boissonnat P. What to call hypoplastic kidney? Arch Dis Child. 1962;37(192):142-8.

46. Ekstrom T. Renal hypoplasia; a clinical study of 179 cases. Acta Chir Scand Suppl. 1955;203:1-168.

47. Graham AP. Hypoplastic kidney, bilateral; case report. J Urol. 1948;60(4):581-5.

48. Gutierrez R. Surgical Aspects of Renal Agenesis. Arch Surg. 1933;27(4):686-735.

49. Bernstein J, Meyer R. Some Speculations on the Nature and Significance of Developmentally Small Kidneys (Renal Hypoplasia). Nephron. 1964;1:137-43.

50. Bernstein J. The morphogenesis of renal parenchymal maldevelopment (renal dysplasia). Pediatr Clin North Am. 1971;18(2):395-407.

51. Hinchliffe SA, Chan YF, Jones H, Chan N, Kreczy A, van Velzen D. Renal hypoplasia and postnatally acquired cortical loss in children with vesicoureteral reflux. Pediatr Nephrol. 1992;6(5):439-44.

52. Weber S, Moriniere V, Knüppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM, et al. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: Results of the ESCAPE study. J Am Soc Nephrol. 2006;17(10):2864-70.

53. Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJD. Evolving Concepts in Human Renal Dysplasia. J Am Soc Nephrol. 2004;15(4):998-1007.

54. Phua YL, Ho J. Renal dysplasia in the neonate. Curr Opin Pediatr. 2016;28(2):209-15.

55. De Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, et al. Germline deletion of the miR-17~92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. Nat Genet. 2011;43(10):1026-30.

56. Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. Nat Genet. 1999;23(1):113-7.

57. Daly SB, Urquhart JE, Hilton E, McKenzie EA, Kammerer RA, Lewis M, et al. Mutations in HPSE2 Cause Urofacial Syndrome. Am J Hum Genet. 2010;86(6):963-9.

58. Porteous S, Torban E, Nam-Pyo C, Cunliffe H, Chua L, McNoe L, et al. Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: Evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. Hum Mol Genet. 2000;9(1):1-11.

59. Ecoles MR, Schimmenti LA. Renal-coloboma syndrome: A multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations. Clin Genet. 1999;56(1):1-9.

60. Nishinakamura R, Matsumoto Y, Nakao K, Nakamura K, Sato A, Copeland NG, et al. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. Development. 2001;128(16):3105-15.

61. Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W. Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes- Brocks syndrome. Nat Genet. 1998;18(1):81-3.

62. Hu MC, Mo R, Bhella S, Wilson CW, Chuang PT, Hui CC, et al. GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. Development. 2006;133(3):569-78.

63. Böse J, Grotewold L, Rüther U. Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. Hum Mol Genet. 2002;11(9):1129-35.

64. Kang S, Graham JM, Olney AH, Biesecker LG. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. Nat Genet. 1997;15(3):266-8.

65. Barak H, Huh SH, Chen S, Jeanpierre C, Martinovic J, Parisot M, et al. FGF9 and FGF20 Maintain the Stemness of Nephron Progenitors in Mice and Man. Dev Cell. 2012;22(6):1191-207.

66. Ferro F, Vezzali N, Comploj E, Pedron E, Di Serafino M, Esposito F, et al. Pediatric cystic diseases of the kidney. J Ultrasound. 2019;22(3):381-393.

67. Raina R, Chakraborty R, Sethi SK, Kumar D, Gibson K, Bergmann C. Diagnosis and Management of Renal Cystic Disease of the Newborn: Core Curriculum 2021. Vol. 78, Am J Kidney Dis. 2021;78(1):125-141.

68. Satariano M, Ghose S, Raina R. The Pathophysiology of Inherited Renal Cystic Diseases. Genes. 2024;15(1):91.

69. 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.

70. Cook WA, Stephens FD. Fused kidneys: Morphologic study and theory of embryogenesis. Birth Defects Orig Artic Ser. 1977;13(5):327-40.

71. Natsis K, Piagkou M, Skotsimara A, Protogerou V, Tsitouridis I, Skandalakis P. Horseshoe kidney: A review of anatomy and pathology. Surg Radiol Anat. 2014;36(6):517-26.

72. Schiappacasse G, Aguirre J, Soffia P, Silva CS, Zilleruelo N. CT findings of the main pathological conditions associated with horseshoe kidneys. Br J Radiol. 2015;88(1045):20140456.

73. Friedland GW, De Vries P. Renal ectopia and fusion. Embryologic basis. Urology. 1975;5(5):698-706.

74. Decter RM. Renal duplication and fusion anomalies. Pediatr Clin North Am. 1997;44(5):1323-41.

75. Woolf AS, Winyard PJD, Hermanns MH, Welham SJM. Maldevelopment of the Human Kidney and Lower Urinary Tract. An Overview. In: The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease. 2003: 377-393.

76. Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T, et al. A novel neurological mutant mouse, yotari, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/Reelin. Neurosci Res. 1997;29(3):217-23.

77. Gao Z, Godbout R. Reelin-Disabled-1 signaling in neuronal migration: Splicing takes the stage. Cellular and Molecular Life Sciences. 2013;(13):2319-29.

78. Diaz-Mendoza MJ, Lorda-Diez CI, Montero JA, Garcia-Porrero JA, Hurle JM. Reelin/DAB-1 signaling in the embryonic limb regulates the chondrogenic differentiation of digit mesodermal progenitors. J Cell Physiol. 2014;229(10):1397-404.

79. Gao Z, Chen X, Zhu K, Zeng P, Ding G. Dab1 contributes to Angiotensin II-induced apoptosis via p38 signaling pathway in podocytes. Biomed Res Int. 2017;2017:2484303.

80. Racetin A, Jurić M, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Durdov MG, et al. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. Croat Med J. 2019;60(6):521-531.

81. 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.

82. Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, et al. Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler- like phenotype in mice. Nature. 1997;389(6652):730-3.

83. Racetin A, Filipović N, Lozić M, Ogata M, Ensor LG, Kelam N, et al. A homozygous dab1−/− is a potential novel cause of autosomal recessive congenital anomalies of the mice kidney and urinary tract. Biomolecules. 2021;11(4):609.

84. Lozić M, Filipović N, Jurić M, Kosović I, Benzon B, Šolić I, et al. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, PanX1, and renin expression patterns in postnatal kidneys of Dab1-/-(Yotari) mice. Int J Mol Sci. 2021;22(3):1284.

85. Saxén L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. Pediatr Nephrol. 1987;1(3):385-92.

86. Dressler GR. The cellular basis of kidney development. Annu Rev Cell Dev Biol. 2006;22:509-29.

87. Tham MS, Smyth IM. Cellular and molecular determinants of normal and abnormal kidney development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2019;8(2):e338.

88. Ryffel GU. What can a frog tell us about human kidney development. Vol. 94, Nephron Exp Nephrol. 2003;94(2):e35-43.

89. Melissa Helen Little. Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration. In: Academic Press. 2016:579–95.

90. De Bakker BS, Van Den Hoff MJB, Vize PD, Oostra RJ. The Pronephros; A Fresh Perspective. Integr Comp Biol. 2019;59(1):29-47.

91. Vize PD, Seufert DW, Carroll TJ, Wallingford JB. Model systems for the study of kidney development: Use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. Dev Biol. 1997;188(2):189-204.

92. Ashbaugh H, Gellman H. Congenital thumb deformities and associated syndromes. J Craniofac Surg. 2009;20(4):1039-44.

93. Fraser EA. The Development of the Vertebrate Excretory System. Biol Rev Camb Philos Soc. 1950;25(2):159-87.

94. Hamilton WJ. Human Embryology. Prenatal Development of Form and Function. South Med J. 1953;46(6).

95. Brändli AW. Towards a molecular anatomy of the Xenopus pronephric kidney. Int J Dev Biol. 1999;43(5):381-95.

96. Chimenti C, Accordi F. Morphology and Ultrastructure of the Pronephros of Testudo hermanni Gmelin, 1789 (Chelonian Reptiles). Journal of Veterinary Medicine Series C: Anat Histol Embryol. 2011;40(2):142-8.

97. Cho GS, Choi SC, Park EC, Han JK. Role of Tbx2 in defining the territory of the pronephric nephron. Development. 2011;138(3):465-74.

98. Davies J. The pronephros and the early development of the mesonephros in the duck. In: J Anat. 1950;84(2):95–103.

99. Vize PD, Woolf AS, Bard JBL. The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease. The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease. 2003;493-519.

100. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Wolters Kluwer; 2015.

101. Kopan R, Cheng HT, Surendran K. Molecular insights into segmentation along the proximal-distal axis of the nephron. J Am Soc Nephrol. 2007;18(7):2014-20.

102. Hendry C, Rumballe B, Moritz K, Little MH. Defining and redefining the nephron progenitor population. Pediat Nephrol. 2011;26(9):1395–1406.

103. Little MH. Renal organogenesis. Organogenesis. 2011;7(4).

104. Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition: Elsevier Science; 2017.

105. Junqueira LC et al. Osnove histologije : udžbenik i atlas. In: Junqueira LC et al., Školska knjiga; 2005. p. 510.

106. Saxén L, Lehtonen E. Embryonic kidney in organ culture. Differentiation. 1987;36(1):2-11.

107. Schwab K, Patterson LT, Aronow BJ, Luckas R, Liang HC, Potter SS. A catalogue of gene expression in the developing kidney. Kidney Int. 2003;64(5):1588-604.

108. Patel SR, Dressler GR. The Genetics and Epigenetics of Kidney Development. Semin Nephrol. 2013;33(4):314-26.

109. Brophy PD, Ostrom L, Lang KM, Dressler GR. Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. Development. 2001;128(23):4747-56.

110. Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubüser A, Busslinger M. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. Genes Dev. 2002;16(22):2958-70.

111. Soofi A, Levitan I, Dressler GR. Two novel EGFP insertion alleles reveal unique aspects of Pax2 function in embryonic and adult kidneys. Dev Biol. 2012;365(1):241-50.

112. Wang Q, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Jiang R. Odd-skipped related 1 (Odd1) is an essential regulator of heart and urogenital development. Dev Biol. 2005;288(2):582-94.

113. James RG, Kamei CN, Wang Q, Jiang R, Schulthesis TM, Schultheiss TM. Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells. Development. 2006;133(15):2995-3004.

114. Mudumana SP, Hentschel D, Liu Y, Vasilyev A, Drummond IA. Odd skipped related1 reveals a novel role for endoderm in regulating kidney versus vascular cell fate. Development. 2008;135(20):3355-67.

115. Chai OH, Song CH, Park SK, Kim W, Cho ES. Molecular regulation of kidney development. Anat Cell Biol. 2013;46(1):19-31.

116. Potter SS, Hartman HA, Kwan KM, Behringer RR, Patterson LT. Laser capture-microarray analysis of Lim1 mutant kidney development. Genesis (United States). 2007;45(7):432-9.

117. Wellik DM, Hawkes PJ, Capecchi MR. Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. Genes Dev. 2002;16(11):1423-32.

118. Gong KQ, Yallowitz AR, Sun H, Dressler GR, Wellik DM. A Hox-Eya-Pax Complex Regulates Early Kidney Developmental Gene Expression. Mol Cell Biol. 2007;27(21):7661-8.

119. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. Genome Biol. 2007;8(5):215.

120. Marek I, Hilgers KF, Rascher W, Woelfle J, Hartner A. A role for the alpha-8 integrin chain (itga8) in glomerular homeostasis of the kidney. Mol Cell Pediatr. 2020;7(1):13.

121. Hartner A, Dötsch J. Lessons in congenital and acquired renal disease from α8 integrin mutant mice. Vol. 17, Pediatr Nephrol. 2002;17(11):882-8.

122. Müller U, Bossy B, Venstrom K, Reichardt LF. Integrin α8β1 promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. Mol Biol Cell. 1995;6(4):433-48.

123. Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. Nat Rev Genet. 2007;8(10):791-802.

124. Marek I, Lichtneger T, Cordasic N, Hilgers KF, Volkert G, Fahlbusch F, et al. Alpha8 integrin (Itga8) signalling attenuates chronic renal interstitial fibrosis by reducing fibroblast activation, not by interfering with regulation of cell turnover. PLoS One. 2016;11(3):e0150471.

125. Humbert C, Silbermann F, Morar B, Parisot M, Zarhrate M, Masson C, et al. Integrin alpha 8 recessive mutations are responsible for bilateral renal agenesis in humans. Am J Hum Genet. 2014;94(2):288-94.

126. Taylor J, Abramova N, Charlton J, Adler PN. Van Gogh: A new Drosophila tissue polarity gene. Genetics. 1998;150(1):199-210.

127. Bailly E, Walton A, Borg JP. The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions. Semin Cell Dev Biol. 2018;81:62-70.

128. Gao B, Song H, Bishop K, Elliot G, Garrett L, English MA, et al. Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. Dev Cell. 2011;20(2):163-76.

129. Lin I, Wei A, Awamleh Z, Singh M, Ning A, Herrera A, et al. Multiomics of Bohring-Opitz syndrome truncating ASXL1 mutations identify canonical and noncanonical Wnt signaling dysregulation. JCI Insight. 2023;8(10):e167744.

130. Hu Z, Xie Y, Lu J, Yang J, Zhang J, Jiang H, et al. VANGL2 inhibits antiviral IFN-I signaling by targeting TBK1 for autophagic degradation. Sci Adv. 2023;9(25):eadg2339.

131. Dunning M, LA, and EM. Illuminahumanv4.db: Illumina HumanHT12v4 Annotation data (chip illuminaHumanv4). R Package. 2015.

132. Hadley Wickham. Reshaping Data with the reshape Package. J Stat Softw. 2007;21(12):1–20.

133. Zuguang GREMS. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. Bioinformatics. 2016;32(18):2847–9.

134. Kassambara A. _ggpubr: "ggplot2" Based Publication Ready Plots_. 2023.

135. Graumann JCR. multipanelfigure: Simple Assembly of Multiple Plots and Images into a Compound Figure. J Stat Softw. 2018;84(3):1–10.

136. R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2023.

137. Aboudehen K, Noureddine L, Cobo-Stark P, Avdulov S, Farahani S, Gearhart MD, et al. Hepatocyte nuclear factor-1β regulates urinary concentration and response to hypertonicity. J Am Soc Nephrol. 2017;28(10):2887-2900.

138. Sanna-Cherchi S, Westland R, Ghiggeri GM, Gharavi AG. Genetic basis of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract. J Clin Invest. 2018;128(1):4-15.

139. Schnapp LM, Breuss JM, Ramos DM, Sheppard D, Pytela R. Sequence and tissue distribution of the human integrin α8 subunit: A β1-associated α subunit expressed in smooth muscle cells. J Cell Sci. 1995;108(2):537-44.

140. Gómez-Conde S, Dunand O, Hummel A, Morinière V, Gauthier M, Mesnard L, et al. Bi-allelic pathogenic variants in ITGA8 cause slowly progressive renal disease of unknown etiology. Clin Genet. 2023;103(1):114-118.

141. Müller U, Wang D, Denda S, Meneses JJ, Pedersen RA, Reichardt LF. Integrin α8β1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. Cell. 1997;88(5):603-13.

142. Linton JM, Martin GR, Reichardt LF. The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin α8β1-mediated stimulation of Gdnf expression. Development. 2007;134(13):2501-9.

143. Babayeva S, Rocque B, Aoudjit L, Zilber Y, Li J, Baldwin C, et al. Planar cell polarity pathway regulates nephrin endocytosis in developing podocytes. J Biol Chem. 2013;288(33):24035-48.

144. Yates LL, Papakrivopoulou J, Long DA, Goggolidou P, Connolly JO, Woolf AS, et al. The planar cell polarity gene Vangl2 is required for mammalian kidney-branching morphogenesis and glomerular maturation. Hum Mol Genet. 2010;19(23):4663-76.

145. Lei YP, Zhang T, Li H, Wu BL, Jin L, Wang HY. VANGL2 Mutations in Human Cranial Neural-Tube Defects. N Engl J Med. 2010;362(23):2232-5.

146. Papakrivopoulou E, Vasilopoulou E, Lindenmeyer MT, Pacheco S, Brzóska H, Price KL, et al. Vangl2, a planar cell polarity molecule, is implicated in irreversible and reversible kidney glomerular injury. J Pathol. 2018;246(4):485-496.

147. Puvirajesinghe TM, Bertucci F, Jain A, Scerbo P, Belotti E, Audebert S, et al. Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer. Nat Commun. 2016;7:10318.

148. Brzóska H, d'Esposito AM, Kolatsi-Joannou M, Patel V, Igarashi P, Lei Y, et al. Planar cell polarity genes Celsr1 and Vangl2 are necessary for kidney growth, differentiation, and rostrocaudal patterning. Kidney Int. 2016;90(6):1274-1284.

149. Cooper J, Giancotti FG. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. Cancer Cell. 2019;35(3):347-367.

150. Kok-Sin T, Mokhtar NM, Hassan NZA, Sagap I, Rose IM, Harun R, et al. Identification of diagnostic markers in colorectal cancer via integrative epigenomics and genomics data. Oncol Rep. 2015;34(1):22-32.

151. Li X, Zhu G, Li Y, Huang H, Chen C, Wu D, et al. LINC01798/miR-17-5p axis regulates ITGA8 and causes changes in tumor microenvironment and stemness in lung adenocarcinoma. Front Immunol. 2023;14:1096818.

152. Ryu J, Koh Y, Park H, Kim DY, Kim DC, Byun JM, et al. Highly expressed integrin-α8 induces epithelial to mesenchymal transition-like features in multiple myeloma with early relapse. Mol Cells. 2016;39(12):898-908.

153. Kiyozumi D, Osada A, Sugimoto N, Weber CN, Ono Y, Imai T, et al. Identification of a novel cell-adhesive protein spatiotemporally expressed in the basement membrane of mouse developing hair follicle. Exp Cell Res. 2005;306(1):9-23.

154. Sebbagh M, Borg JP. Insight into planar cell polarity. Exp Cell Res. 2014328(2):284-95.

155. Walton A, Revinski D, Sergé A, Audebert S, Camoin L, Puvirajesinghe TM, et al. A novel Golgi-associated Vangl2 translational variant required for PCP regulation in vertebrates. J Biol Chem. 2020.

156. Jessen JR, Solnica-Krezel L. Identification and developmental expression pattern of van gogh-like 1, a second zebrafish strabismus homologue. Gene Expr Patterns. 2004;4(3):339-44.

157. Torban E, Kor C, Gros P. Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates. Trends Genet. 2004;20(11):570-7.

158. Kunimoto K, Bayly RD, Vladar EK, Vonderfecht T, Gallagher AR, Axelrod JD. Disruption of Core Planar Cell Polarity Signaling Regulates Renal Tubule Morphogenesis but Is Not Cystogenic. Curr Biol. 2017;27(20):3120-3131.

159. Yates LL, Schnatwinkel C, Murdoch JN, Bogani D, Formstone CJ, Townsend S, et al. The PCP genes Celsr1 and Vangl2 are required for normal lung branching morphogenesis. Hum Mol Genet. 2010;19(11):2251-67.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Nikola Pavlović

Datum rođenja: 05.12.1996.

Spol: Muško

Državljanstvo: Hrvatsko

Narodnost: Hrvat

OBRAZOVANJE

2021 – 2025 Doktorski studij Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE), Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, Hrvatska

2015 – 2020 Sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

04/2024 – trenutno **Asistent na projektu**

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Laboratorij za Istraživanje ranog razvoja čovjeka

Projekt: Genetska dijagnostika malformacija bubrega i mokraćnog sustava

Mentor: prof. dr. sc. Katarina Vukojević, dr. med., MefSt, Split, Hrvatska

07/2021 – 04/2024 **Asistent na projektu**

Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS), Split, Hrvatska

Projekt: Stanična parabioza: uloga međustanične komunikacije u fenotipskoj supresiji

Mentor: dr. sc. Katarina Trajković, MedILS, Split, Hrvatska

03/2020 – 11/2020 **Studentski asistent (izrada diplomskog rada)**

Medicinski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Projekt: Određivanje obrasca lncRNA molekula PACER i ZEB1- AS1 u pacijenata s kalcificirajućom stenozom aortnih zalistaka srca

	Mentor: izv. prof. dr. sc. Frane Paić, MefZg, Zagreb, Hrvatska
06/2019 – 08/2019	**Studentski asistent** Sveučilište Eberhard Karls, Odjel za infektivnu biologiju, Tübingen, Njemačka Mentor: dr. sc. Simon Heilbronner
02/2019 – 04/2019	**Studentski asistent** Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, Zagreb, Hrvatska Mentor: dr. sc. Beata Halassy, znanstveni savjetnik

RAZVOJ PRENOSIVIH VJEŠTINA

10-12/09/2024	EMBO tečaj za pisanja projekata, znanstvenih radova i znanstvenu komunikaciju – Medicinski fakultet u Splitu, Split, Hrvatska
02-06/10/2023	BIP doktorska edukacija – Sveučilište u Valladolidu, Valladolid, Španjolska
17-21/04/2023	SEA-EU: Tečaj poduzetničkih vještina – Sveučilište u Cádizu, Cádiz, Španjolska
12-16/07/2021	Ljetna škola znanstvene komunikacije, MedILS, Split, Hrvatska
02/2019	Tečaj za rad s laboratorijskim životinjama (FELASA B) – Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

SUDJELOVANJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA

10-12/06/2024	"BEING SEA-EU" konferencija, Valletta, Republika Malta (*poster)*
09-12/04/2024	EMBO radionica "Developmental circuits in aging", Nica, Francuska *(poster)*
15-19/09/2023	Advances in Biomedical Research V, Split, Hrvatska (*poster*)
18-20/05/2023	ABMBIH konferencija, Sarajevo, Bosna i Hercegovina (*poster*)
21-26/09/2021	EMBO radionica "System approaches in cancer", Split, Hrvatska

MENTORIRANJE

1 diplomand (Lucija Miseta, MedILS, Split, Hrvatska; naslov diplomskog rada: “Stanična parabioza”)

NAGRADE

Rektorova nagrada za akademsku godinu 2019./2020.

VOLONTERSKI RAD

Dan i noć biologije, Europska noć istraživača, Tjedan mozga, Ljetna škola znanosti

DODATNE VJEŠTINE

Jezične vještine

• hrvatski – materinji jezik

• engleski – C1, napredna razina korištenja

• španjolski – B1, srednja razina korištenja

Vozačka dozvola

• B kategorija

IT vještine

• Microsoft Office Package, GraphPad Prism, ImageJ

PUBLIKACIJE

- **N. Pavlović**, N. Kelam, A. Racetin, N. Filipović, Z. Pogorelić, I. Kuzmić Prusac, K. Vukojević. Expression Profiles of ITGA8 and VANGL2 are Altered in Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract (CAKUT). *Molecules*. **2024**

- S. Žužul, N. Kelam, A. Racetin, P. Kovačević, S. Konjevoda, N. Filipović, **N. Pavlović**, K. Vukojević. The Role of Megalin, Cubilin, Caveolin 1, Gipc1 and Dab2IP in Embryonic and Postnatal Kidneys of *Yotari* (*Dab1-/-*) mice. *Biomedicines*. **2024**