

# Značaj izražaja CRKL, AIFM3 i UBASH3A tijekom razvoja humanog bubrega

---

**Lozić, Mirela**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:380248>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-04**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Mirela Lozić**

**ZNAČAJ IZRAŽAJA *CRKL*, *AIFM3* I *UBASH3A* TIJEKOM RAZVOJA  
HUMANOG BUBREGA**

**Doktorski rad**

**Akadska godina: 2021./2022.**

**Mentor:**

**Prof. dr. sc. Katarina Vukojević**

**U Splitu, 2022.**

*Zahvaljujem se svima koji su mi olakšali ovaj zahtjevni period.*

*Hvala prof. dr. sc. Glavini Durdov na pomoći oko usavršavanja doktorata.*

*Hvala mentorici prof. dr. sc. Vukojević na pruženoj prilici.*

*Posebno se zahvaljujem svojim „molekolicama“ što su sve prošle skupa sa mnom, dobro i loše.*

# Sadržaj

Popis oznaka i kratica.....	1
<b>1. UVOD.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Bubrež.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Razvoj bubrež.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Kongenitalne anomalije bubrež i urotrakta (CAKUT).....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Podocitopatije.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2. Bolest minimalnih promjena.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. CAKUT kandidat geni.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.1. AIFM3 (engl. apoptosis inducing factor mitochondria associated 3).....</b>	<b>13</b>
1.5.1.1. Apoptotska uloga AIF i AIFM3.....	13
1.5.1.2. Uloge AIF i AIFM3 u oksidacijskoj fosforilaciji.....	15
1.5.1.3. Izražaj AIFM3 u bubrež.....	15
<b>1.5.2. CRKL (engl. CRK like proto-oncogene, adaptor protein).....</b>	<b>17</b>
1.5.2.1. Izražaj CRKL u bubrež.....	18
<b>1.5.3. UBASH3A (engl. ubiquitin associated and SH3 domain containing A).....</b>	<b>20</b>
1.5.3.1. Izražaj UBASH3A u bubrež.....	22
1.5.3.2. Uloga UBASH3A u apoptozi.....	23
1.5.3.3. CAKUT u Down sindromu.....	23
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE.....</b>	<b>25</b>
<b>3. METODE I MATERIJALI.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Prikupljanje tkiva i etička načela.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Histološka analiza.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Obrada tkiva za histokemijske metode.....	28
3.2.2. Hematoksilin i eozin metoda.....	28
3.2.3. Indirektna imunohistokemija.....	29
<b>3.3. Izolacija RNA i RT-qPCR.....</b>	<b>34</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Histološka analiza uzoraka bojanih H&amp;E metodom.....</b>	<b>37</b>
4.1.1. Kvantitativna analiza izražaja AIFM3 i AIF po razvojnim fazama bubrež.....	39
4.1.2. Kvalitativna analiza AIFM3 u ispitanika s CAKUT-om.....	47
<b>4.2. UBASH3A.....</b>	<b>49</b>
4.2.1. Kvantitativna analiza izražaja UBASH3A po razvojnim fazama bubrež.....	49

4.2.2. Kvalitativna analiza FSGS i MCD.....	52
4.2.3. Kvalitativna analiza Down sindroma s CAKUT fenotipom.....	54
4.3. <i>CRKL</i> .....	56
4.3.1. Kvantitativna analiza izražaja <i>CRKL</i> po razvojnim fazama bubrega .....	56
4.3.2. Kvalitativna analiza CAKUT uzoraka.....	58
5. RASPRAVA.....	59
6. ZAKLJUČAK .....	69
7. SAŽETAK .....	71
8. SUMMARY .....	73
9. POPIS LITERATURE .....	75
10. KRATKI ŽIVOTOPIS .....	88

## Popis oznaka i kratica

*AIF* – *engl.* apoptosis inducing factor

*AIFM3* – *engl.* apoptosis inducing factor mitochondria associated 3

*BCL2* – *engl.* B-cell lymphoma 2

CAKUT – kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta (*engl.* congenital anomalies of the kidney and urinary tract)

ccRCC – svijetlostanični karcinom bubrega

*CRK* – *engl.* CRK proto-oncogene, adaptor protein

*CRKL* – *engl.* CRK like proto-oncogene, adaptor protein

CSB – tijelo u obliku zareza (*engl.* comma-shaped body)

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

DS – Down sindrom

ER – endoplazmatski retikulum

ETC – lanac prijenosa elektrona (*engl.* electron transport chain)

FB – filtracijska barijera

FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza

GBM – glomerularna bazalna membrana

GFR – *engl.* glomerular filtration rate

H&E – hematoksilin-eozin bojanje

IG – nezreli glomerul (*engl.* immature glomerulus)

MCD – bolest minimalnih promjena (*engl.* minimal change disease)

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

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

OXPHOS – oksidacijska fosforilacija

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

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

Ph1 – faza 1

Ph2 – faza 2

Ph3 – faza 3

Ph4 pre – prenatalna faza 4

Ph4 1M – faza 4, starosti jedan mjesec

Ph4 1.5Y – faza 4, jedna i pol godina starosti

PUV – stražnji ureteralni zalisci (*engl.* posterior urethral valves)

RT-qPCR – *engl.* quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

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

SD – standardna devijacija

SH2 – domena homologna sa Src 2 (*engl.* Src-homology 2)

SH3 – domena homologna sa Src (*engl.* Src-homology 3)

SSB – tijelo u obliku slova S (*engl.* S-shaped body)

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

UBASH3A – *engl.* ubiquitin associated and SH3 domain containing A

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

VUR – vezikoureteralni refluks

w – tjedan (*engl.* week)

# **1. UVOD**



Hipokrata smatraju prvim embriologom, a njegovi zapisi o embriološkim istraživanjima datiraju od 460. pr. Kr. – 370. pr. Kr. Hipokrat je tvrdio da se embrij razvija izvlačenjem vlage i daha iz majke i razmatrao je niz kondenzacija i vatri odgovornih za razvoj kostiju, trbuha i krvotoka embrija i fetusa. Njegova je ideja bila da se meso diferencira u različite tjelesne organe (1).

Posljednjih desetljeća otkriveni su ključni mehanizmi koji pokreću ontogenetski razvoj u sisavaca, ali mnoga osnovna pitanja ostaju neodgovorena. Jedan od složenih razvojnih procesa jest nastanak i sazrijevanje mokraćnog sustava u koji se ubrajaju bubrezi, mokraćovodi, mokraćni mjehur i mokraćna cijev, organi koji sudjeluju u stvaranju i eliminaciji mokraće (2).

## **1.1. Bubrež**

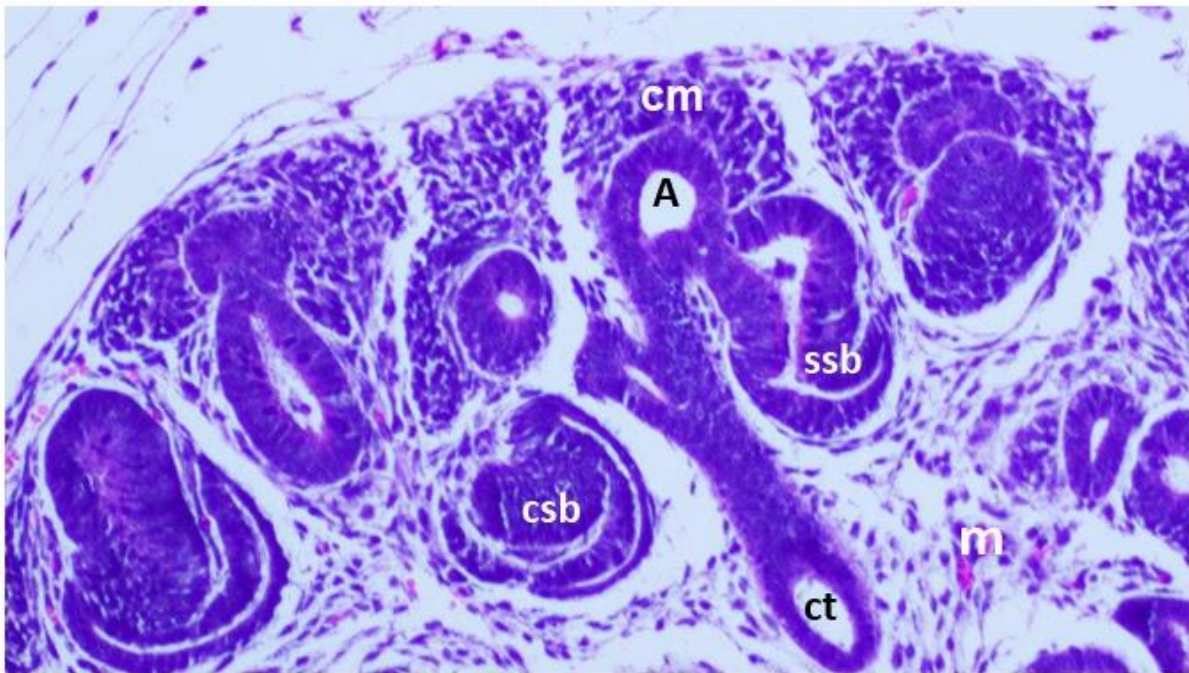
U sisavaca je bubrež vitalni organ složene građe koji ima bitnu ulogu u homeostazi organizma. Dva bubrež su smještena retroperitonealno uz stražnju stijenku trbuha. Svaki bubrež je okružen vezivnom čahuricom pod kojom je bubrežni parenhim podijeljen na koru i srž. Fetalni i novorođenački bubrež su reznjeviti, što se u dojenačkoj dobi mijenja i konačno površina organa postaje glatka (3). Bubrezi igraju ključnu ulogu u uklanjanju metaboličkog otpada, održavanju volumena tjelesnih tekućina, elektrolita i krvnog tlaka, te gustoće skeleta (4). Temeljna funkcionalna jedinica bubrež je nefron. Bubrež se sastoji od 200 000 do 2 milijuna nefrona koji su sastavljeni od bubrežnih tjelešaca, glomerula i sustava kanalića, tubula. (5). Ultrafiltrat iz glomerula prelazi u tubule, postupno se modificira selektivnom resorpcijom i sekrecijom i konačno nastaje koncentrirana mokraća koja iz sabirnih cijevi kroz ušća papila kapa u čašice i nakapnicu. U proksimalnom tubulu zbiva se najveća reapsorpcija tvari iz ultrafiltrata, u srednjem dijelu tzv. Henleovoj petlji mokraća se koncentrira, a u distalnom tubulu i sabirnim cijevima precizno se podešava koncentracija soli i acidobazna ravnoteža. Cjelokupni proces nastanka i eliminacije mokraće važan je za regulaciju razine elektrolita, osmolarnosti, krvnog tlaka i pH pa se poremećaj funkcije nefrona očituje različitim, klinički važnim, patološkim stanjima (6).

## 1.2. Razvoj bubrega

U 4. razvojnom tjednu se iz intermedijarnog mezoderma dorzalne stijenke humanog zametka počne razvijati urinarni sustav, a razvoj je strogo vremenski reguliran. Uzdužno uzvišenje mezoderma tzv. urogenitalni nabor se formira sa svake strane dorzalne aorte. Dio urogenitalnog nabora iz kojeg nastaje mokraćni sustav je nefrogena vrpca iz koje izlaze tri kranio-kaudalno postavljene strukture - pronefros, mezonefros i metanefros (2). Pronefros (predbubreg) je prvi i građen je od pronefričnog kanala i 6-10 parova nefrotoma. Pronefros nije funkcionalan, te degenerira do kraja 4. tjedna i zaostane samo kaudalno. Prije toga počinje oblikovanje mezonefrosa (prabubrega) koji se ulijeva u kloaku. Mezonefros je građen od mezonefričkog Wolffovog kanala i mezonefričkih tubula koji su prolazne filtracijske jedinice. Mezonefrički tubuli su šuplje cijevi u obliku slova S čiji bočni krajevi ulaze u mezonefrični kanal, a medijalni dio formira Bowmanovu čahuru oko glomerula. Mezonefros i trajni bubreg (metanefros) neko vrijeme koegzistiraju, a potom mezonefrički tubuli degeneriraju (7). Metanefros nastaje u 5. razvojnom tjednu, međusobnom interakcijom metanefričkog mezenhima (*engl.* metanephric mesenchyme - MM) i mokraćovodnog pupoljka (*engl.* ureteric bud - UB) koji urasta iz mezonefričkog kanala u MM. MM potiče UB na grananje čime nastanu odvodni kanalići i mokraćovod. Uz to, MM prolazi mezenhimsko-epitelnu pretvorbu (*engl.* mesenchymal to epithelial transition - MET) i postupnu diferencijaciju u različite epitelne stanice koje pod indukcijom ampule (završne grane UB) formiraju nefron (8). Prijelazne faze su bubrežni mjehurić (*engl.* renal vesicle - RV), koji se postupno diferencira u tijelo u obliku zarezca (*engl.* comma shaped body - CSB ) i tijelo u obliku slova S (*engl.* S-shaped body - SSB). Jedan kraj SSB se spaja s ampulom koja ga je inducirala, a drugi kraj okruži klupko kapilara tvoreći glomerul (2).

Glomerul je klupko razgranatih i anastomoziranih kapilara u Bowmanovom prostoru okruženom Bowmanovom čahuricom. Građen je od četiri tipa stanica. Kapilare su obložene fenestriranim endotelom koji leži na glomerularnoj bazalnoj membrani (GBM), a s vanjske strane je sloj podocita, visceralnih epitelnih stanica koje su nožicama učvršćene za GBM i potpuno je prekrivaju. Vrlo selektivna filtracijska barijera (FB) glomerula sačinjena je od fenestriranog endotela, negativno nabijene GBM i pukotinastih opni (*engl.* slit diaphragm) među susjednim nožicama podocita koje su ispunjene nefrinom. FB je propusna za male i srednje molekule (voda, elektroliti, glukoza, urea, kreatinin i minimum malih proteina), a nepropusna za veće proteine plazme i krvne stanice. Mezangijske stanice i matriks daju

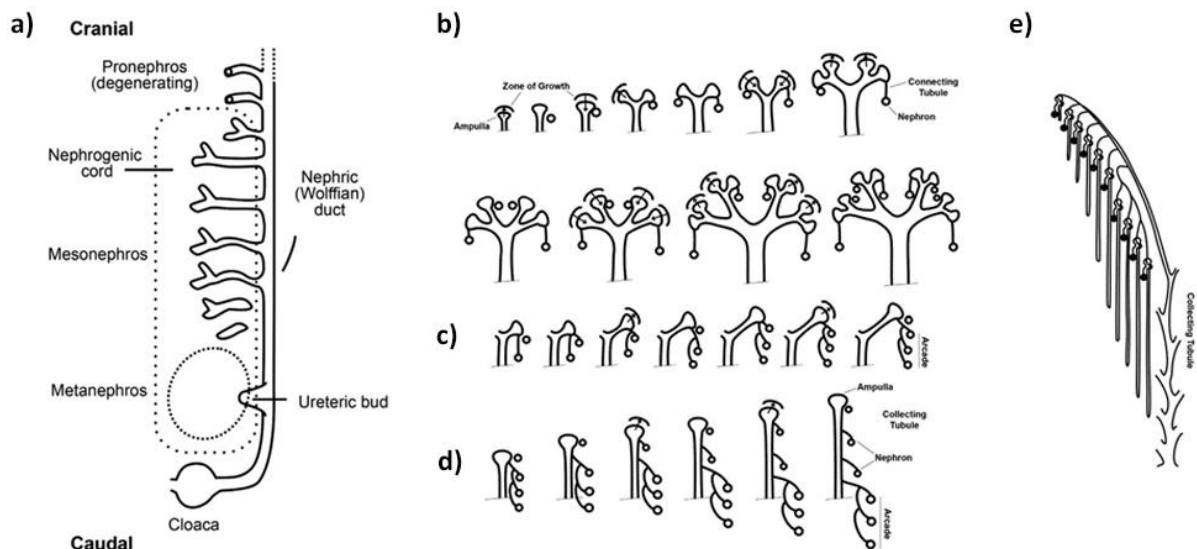
strukturnu potporu glomerularnim kapilarama. Glomerul je okružen urinarnim prostorom koji je ograničen Bowmanovom čahuricom, s unutarnje strane obložen jednim slojem pločastog tzv. parijetalnog epitela (9). Od 10. razvojnog tjedna ultrafiltrat se počinje skupljati u Bowmanov prostor i prazniti preko urinarnog pola u lumen tubula, te metanefros počne funkcionirati kao trajni bubreg. U daljnjem razvoju organa, bubrezi rastu uglavnom zbog produljenja nefrona i njegove diferencijacije tijekom fetalnog razdoblja (10). U dojenačkom razdoblju se brzina glomerularne filtracije (*engl.* glomerular filtration rate - GFR) jako poveća, što utječe na promjene u tubularnom transportu u svrhu očuvanja glomero-tubularne ravnoteže (11).



**Slika 1.** Područje rasta u korteksu bubrega - nefrogena zona. Mezenhim (m) se kondenzira u vršni mezenhim (cm) koji se pod utjecajem ampule (A) transformira u bubrežni mjehurić. Iz bubrežnog mjehurića se dalje oblikuje tijelo u obliku zarez (csb) i tijelo u obliku slova S (ssb). Sabirni kanal (ct) odvodi stvorenu mokraću. Fotografija je izvorno učinjena na arhiviranom preparatu humanog bubrega u 10. razvojnog tjedna na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju MEFST-a.

Kad ampula UB-a dođe u kontakt s MM, započne se brzo binarno granati. Ampule mogu napredovati prema periferiji, ili se podijeliti i stvoriti dvije nove ampule (10). Dr. Potter je prva opisala način grananja ampula i objasnila razvoj humanog bubrega u četiri razvojne faze. Tijekom prve faze (Ph1) od 5. tjedna do 14. tjedna razvoja, svaka ampula inducira jedan nefron. U drugoj fazi (Ph2) od 15. tjedna do 20. - 22. tjedna razvoja, ampule se dijele sporadično i jedna ampula može inducirati nekoliko nefrona koji se sabirnim kanalima spajaju u arkade. Od 20.- 22. tjedna, bubreg je u trećoj fazi (Ph3) kada ampule napreduju lokalnom proliferacijom stanica i induciraju pojedinačne nefrone. Konačno, od 32.-36. tjedna razvoja,

bubreg je u četvrtoj fazi (Ph4) koju karakterizira nestanak ampule, umnažanje intersticija i diferencijacija stanica koja se nastavlja nakon rođenja (Slika 2) (10,12). Volumen glomerula se povećava, Henleove petlje nastavljaju rasti u duljinu, a zavijeni tubuli postaju duži i vijugaviji. Nezreli nefroni se mogu naći u vanjskoj kori bubrega u djece do navršene prve godine života (11).



**Slika 2.** Shematski prikaz razvoja sustava za izlučivanje mokraće u sisavaca u fazi lateralnog rasta mokraćnog pupoljka iz Wolfvogovog kanala i indukcije metanefričnog mezenhima (a). Shematski prikaz grananja ampula u prvoj (b), drugoj (c), trećoj (d) i četvrtoj (e) razvojnoj fazi bubrega. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 10)

### 1.3. Kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta (CAKUT)

U pravilu, što je razvojni proces složeniji, veća je vjerojatnost pojave razvojnih nepravilnosti. Mnoge bubrežne bolesti imaju genetsko podrijetlo. Većina djece s bubrežnim zatajenjem koje progredira u terminalno otkazivanje bubrega i 10% odraslih ovisnih o dijalizi/transplantaciji, imaju nasljedni poremećaj (10).

Kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta (*engl.* congenital anomalies of the kidney and urinary tract - CAKUT) obuhvaćaju sve malformacije čiji je ishod nepravilni razvoj bubrega i mokraćnog sustava. Dr. Potter je na temelju obdukcijских nalaza djece umrle u perinatalnoj i dojenačkoj dobi opisala i klasificirala razvojne abnormalnosti bubrega i urotrakta. Makroskopski su kongenitalne malformacije bubrega karakterizirane promjenom u veličini, obliku, položaju ili broju bubrega, a mikroskopski manjkom nefrona i/ili abnormalnom

histološkom građom (Tablica 1) (12). Prostorni i vremenski događaji izazvani genskim mutacijama odredit će različite CAKUT fenotipove. U ranoj fazi razvoja nastaju velike mane kao ageneza bubrega i/ili malformirani bubreg, a u kasnoj fazi razvoja manji defekti kao opstrukcija, vezikoureteralni refluks (VUR) ili stražnji ureteralni zalistak (*engl.* posterior urethral valves - PUV); bubrezi su formirani, a izlazni trakt nepravilan (13). Najčešći CAKUT fenotipovi su hipodisplastični bubrezi, ageneza bubrega, hidronefroza, opstrukcija ureteropelvičnog spoja (*engl.* ureteropelvic junction obstruction - UPJO), megaureter, dvostruki mokraćovod, VUR i multicistični displastični bubreg (14). Patofiziološka osnova CAKUT-a je mutacija gena koji reguliraju proces normalnog razvoja bubrega. Pretpostavlja se da su to transkripcijski čimbenici, uključeni u interakciju proteina koji tvore velike transkripcijske komplekse i imaju ključnu ulogu u embrionalnom razvoju bubrega (15,16). Većina CAKUT slučajeva su sporadični, a u 15% slučajeva postoji obiteljska agregacija CAKUT-a i autosomno dominantno nasljeđivanje s promjenjivom ekspresijom i nepotpunom penetracijom. Koji put je CAKUT bez dodatnih anomalija, tzv. izolirani CAKUT, ali je češće dio složenog sindromskog CAKUT fenotipa. Opisano je više od 500 sindroma koji mogu imati bubrežne ili urinarne anomalije, primjerice Down sindrom i Edwardsov sindrom (14).

CAKUT-a se očituje spektrom kliničkih slika - od nepravilnosti građe koja je potpuno asimptomatska do terminalnog bubrežnog zatajenja. U CAKUT-u je varijabilna udruženost genotipa i fenotipa, kako među članovima obitelji s istom mutacijom, tako u dva bubrega istog bolesnika. Promjene jednog gena mogu rezultirati širokim spektrom fenotipskih promjena - od izolirane zahvaćenosti bubrega do sindromskog CAKUT-a sa značajnim malformacijama više organa (15). Fenotipska i genetska heterogenost koji put zavara kliničku sumnju na genetski poremećaj. S druge strane, predstavlja poticaj istraživačima za otkrivanje novih gena povezanih s CAKUT-om. Određivanje genetske osnove CAKUT-a u pojedinog bolesnika rezultiralo bi specifičnom dijagnozom i odgovarajućim liječenjem, objašnjenjem genetike patološkog stanja i genetskim savjetovanjem. Uz to bi bilo moguće otkriti asimptomatske članove obitelji koji su prenositelji bolesti i kategorizirati CAKUT za klinička ispitivanja (17).

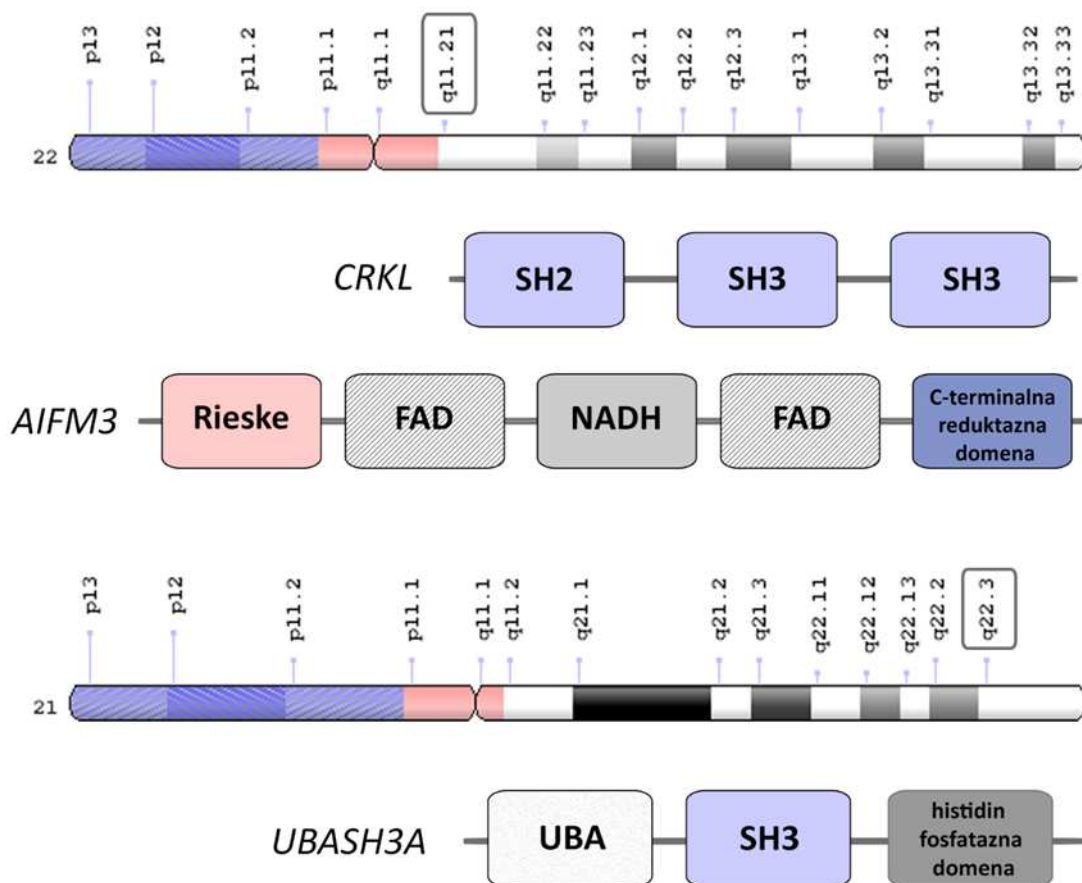
**Tablica 1.** Kategorije CAKUT poremećaja

Vrsta anomalije	CAKUT poremećaj	Definicija
Broj	Ageneza bubrega	Jednostrana ili obostrana, bubrežni i odljevni sustav nisu stvoreni
Veličina i morfologija	Hipoplazija bubrega	Jednostrana ili obostrana, oblik bubrega je normalan, ali je manji i s manjim brojem nefrona
	Displazija bubrega	Jednostrana ili obostrana, oblik bubrega i diferencijacija tkiva nisu pravilni, smanjen je broj nefrona
	Policistična displazija bubrega	Brojne ciste u displastičnom bubregu nepravilnog oblika
Pozicija	Potkovasti bubreg	Bubrezi su srasli jednim polom u obliku potkove
	Ektopični bubreg	Bubreg na abnormalnom mjestu, obično u zdjelici
Abnormalnosti odljevanja mokraće	Opstrukcija uretero - pelvičnog spoja	Jednostrana ili obostrana, spoj između bubrega i mokraćovoda je funkcionalno zatvoren, što onemogućava izlazak mokraće iz bubrežne zdjelice
	Vezikoureteralni refluks	Jednostrana ili obostrana, spoj između mokraćovoda i mokraćnog mjehura nije normalan, što rezultira retrogradnim povratom mokraće iz mokraćnog mjehura tijekom mikcije
	Udvostručeni sustav za prikupljanje urina	Jednostrana ili obostrana, udvostručenje mokraćovoda i bubrežne zdjelice može biti popraćeno dvostrukim bubrežima; odljevni sustav može vraćati mokraću ili je opstruiran
	Megaureter	Jednostrana ili obostrana, distenzija mokraćovoda rezultira poremećenim protokom mokraće
	Stražnji ureteralni zalistak	Membrana u sluznici mokraćne cijevi sprječava pražnjenje mokraćnog mjehura, mana je ograničena na muški spol

U laboratoriju je razvijeno više monogenских *knockout* modela miševa čiji potomci imaju fenotipski spektar koji oponaša CAKUT u ljudi (18). Do danas su poznate mutacije više od 200 gena povezanih s nasljednim bubrežnim poremećajima. S druge strane, 85% bolesnika s CAKUT-om nemaju mutaciju ni u jednom poznatom genu (14). Stoga je istraživački izazov identificirati komponente koje nedostaju u patogenezi CAKUT-a kako bi bolje razumjeli ulogu proteina i kompleksa transkripcijskih čimbenika u razvojnim i tkivno-specifičnim funkcijama. *In silico* analiza baze podataka dobivene sekvenciranjem cijelog genoma bolesnika s potvrđenim CAKUT-om, provedena u Irving Medicinskom centru Sveučilišta Columbia u New Yorku, SAD, ukazala je na *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A* kao moguće kandidat gene za CAKUT pa je ovo istraživanje usmjereno na njih (Tablica 2, Slika 3).

**Tablica 2.** Predloženi CAKUT kandidat geni.

Gen	Kromosomska lokacija	Pseudonimi
<i>CRKL</i>	22q11.21	-
<i>AIFM3</i>	22q11.21	<i>AIFL</i>
<i>UBASH3A</i>	21q22.3	<i>TULA</i> ; <i>CLIP4</i> ; <i>STS-2</i> ; <i>TULA-1</i>



**Slika 3.** Shematski prikaz humanih kromosoma 22 i 21 s naznačenim citogenetskim lokusima (označeni sivim okvirom) predloženih kandidata gena *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A* i strukturu njihovih proteina *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A*. Prikazane su glavne funkcionalne domene proteina: domena Src-homologije 2 (SH2), domena Src-homologije 3 (SH3), Rieske-tip domene (Rieske), FAD-vezujuća domena (FAD), NADH-vezujuća domena (NADH), C-terminalna reduktazna domena, domena asocirana s ubikvitinom (UBA) i histidin fosfatna domena. Ideogrami humanih kromosoma 21 i 22 preuzeti su s <https://ghr.nlm.nih.gov>. Shematske strukture proteina su izvorni rad autora.

## 1.4. Podocitopatije

Podociti igraju ključnu ulogu u očuvanju funkcije FB jer sintetiziraju GBM i nožicama omeđuju pukotinaste opne. To su stabilne stanice koje se nakon rođenja ne dijele. U većini humanih glomerulopatija, podociti na oštećenje reagiraju preslagivanjem aktinskog citoskeleta, što rezultira gubitkom nožica i ponekad odvajanjem podocita od GBM s posljedičnom podocitopenijom. Oštećenje podocita praćeno je proteinurijom. Pojačano propusne glomerularne kapilare budu s vremenom segmentalno sklerozirane umnoženim mezangijskim matriksom i taj dio glomerula izgubi opskrbu krvlju i filtracijsku funkciju. S vremenom fokalna/difuzna glomeruloskleroza vodi u progresivno bubrežno zatajenje (19, 20). U spektru podocitopatija na jednom je kraju bolest minimalnih promjena (*engl.* minimal change disease - MCD), a na drugom fokalna segmentalna glomeruloskleroza (FSGS) (21). Određivanje molekula i regulatornih mehanizama koji održavaju citoskelet omogućava bolji uvid u fiziologiju podocita i potencijalnu ciljanu terapiju u raznim glomerulopatijama.

### 1.4.1. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza

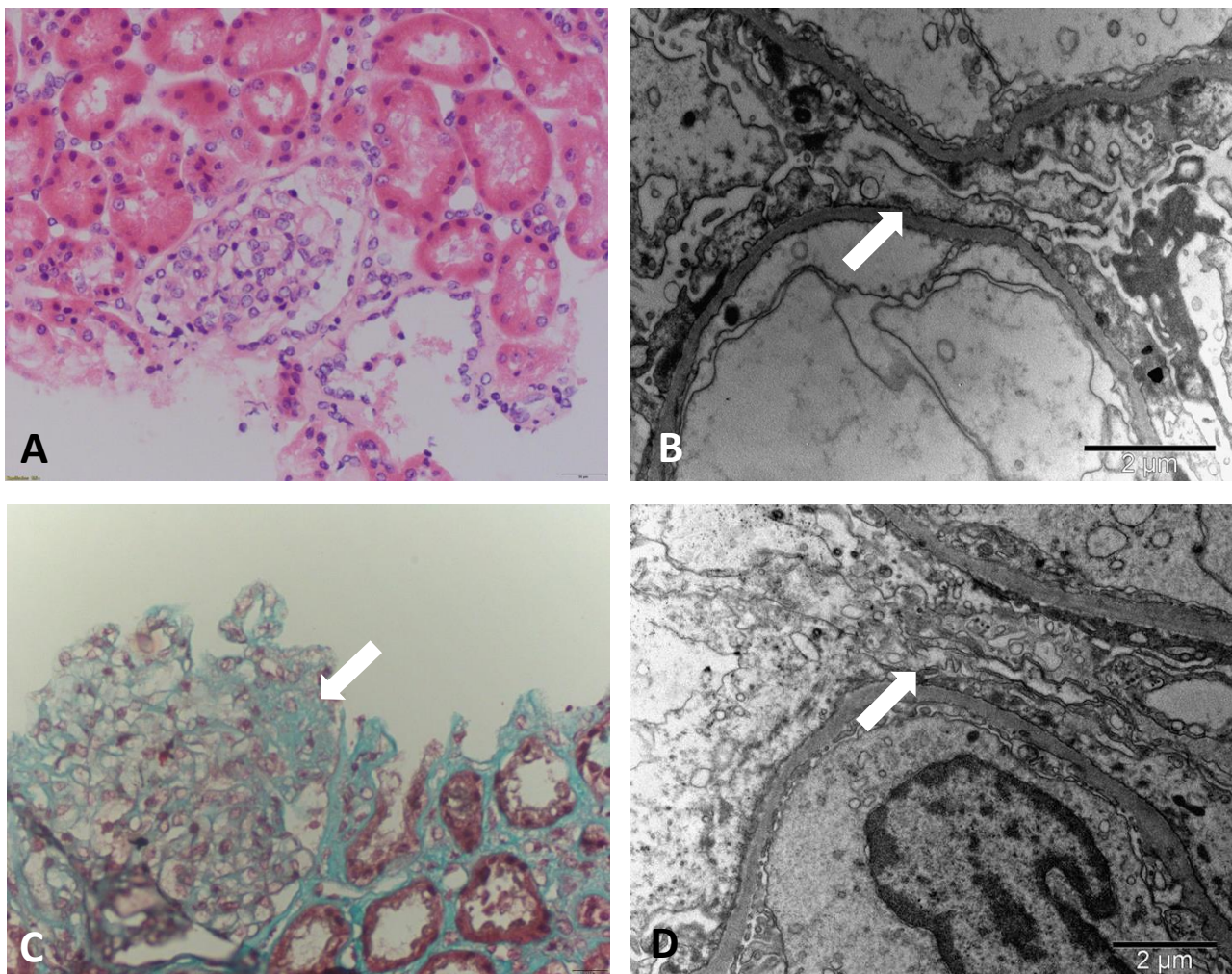
Fokalna segmentalna glomeruloskleroza (FSGS) je jedan od najčešćih uzroka terminalnog stadija kronične bubrežne bolesti. Klinički je karakterizirana proteinurijom nefrotskog ranga, a morfološki sklerotičnim segmentima u pojedinim glomerulima (22). Bolest je kroničnog i sporo progresivnog tijeka. Primarna FSGS je nepoznatog uzroka, a sekundarna FSGS rezultat različitih poremećaja na nivou nefrona - mutacije gena vezanih uz podocite, te oštećenja podocita u glomerulopatijama imunih kompleksa, hipertenziji, pretilosti, oštećenju lijekovima, tubulointersticijskoj bolesti i drugim bolestima (21). U odraslih bolesnika sa sporadničnom FSGS rijetki su genetski uzroci (22). S druge strane, u mladih odraslih bolesnika od 18 do 25 godina s FSGS-om rezistentnom na steroide, u 20% slučajeva se radi o monogenskom uzroku FSGS (21).

### 1.4.2. Bolest minimalnih promjena

Bolest minimalnih promjena (MCD) manifestira se nefrotskim sindromom s morfološki urednim glomerulima na svjetlosnoj mikroskopiji i opsežnim gubitkom nožica podocita na elektronskoj mikroskopiji. Potpuna remisija obilne proteinurije nastupa nakon bolusnog liječenja kortikosteroidima (23). U odraslih, na MCD otpada 15% slučajeva s idiopatskim nefrotskim sindromom, a u djece starije od godine dana 70% - 90% (21). Bolest je



povezana s akutnim imunološkim poremećajem kao što je alergija, infekcija ili cijepljenje. Alergen, bakterijski lipopolisaharidi ili IL-13 vežu se za podocit i izazivaju produženi izražaj CD 80. To mijenja aktivnost podocita, strukturu citoskeleta i kvalitetu sintetizirane GBM koja gubi negativni naboj. Pojačana propusnost GBM uzrokuje proteinuriju nefrotskog ranga i difuzni gubitak nožica podocita. Imunološki sustav suzbija neželjenu reaktivnost Treg stanicama koje otpuštaju CTLA-4 i IL-10 i suprimiraju izražaj CD80 na podocitima. Do danas nisu nađeni genetski uzroci MCD-a (21).



**Slika 7.** Glomerul u MCD izgleda uredno na svjetlosnoj mikroskopiji (HE 100x, A), ali na elektronskoj mikroskopiji vidi se potpuni gubitak nožica podocita (B). Glomerul u FSGS pokazuje jedan sklerozirani segment (Mallory 200x, C), a na elektronskoj mikroskopiji ekstenzivni gubitak nožica, viloznu transformaciju i vakuolizaciju podocita (D).

## 1.5. CAKUT kandidat geni

### 1.5.1. *AIFM3* (*engl. apoptosis inducing factor mitochondria associated 3*)

*AIFM3* gen, mapiran na kromosomu 22q11.21, kodira istoimeni intracelularni protein (24). Njegov translacijski proizvod AIFM3 pripada obitelji čimbenika koji izazivaju apoptozu (*engl. apoptosis-inducing factor - AIF*). U humanom proteomu ta obitelj ima tri proteina: AIF, AIFM2 i AIFM3, a nazivaju se *moonlighting* proteini jer im se funkcija mijenja ovisno o okolišu (25). Najbolje karakterizirani član obitelji je *AIF* u citogenetskom lokusu Xq26.1, dok su saznanja o *AIFM3* skromnija. Ova dva različita AIF-a su flavoproteini kojima je zajednička lokalizacija u mitohondriju, prisutnost domena ovisnih o FAD-u i NADH uključenih u oksidoreduktaznu funkciju, te sposobnost indukcije programirane stanične smrti (26). Članovi obitelji AIF sintetiziraju se u citosolu i lokaliziraju u međumembranskom prostoru mitohondrija (27). AIF i AIFM3 su identični u 35% sekvence, od čega je 27% u domeni oksidoreduktaze ovisne o flavinu (Pyr\_redox\_2 domena) koja im omogućava ulogu u oksidativnoj fosforilaciji. AIF ima pro-apoptotsku C-terminalnu domenu, a AIFM3 N-terminalnu Rieske domenu i C-terminalnu reduktaznu domenu. Rieske domene se često nalaze u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona (*engl. electron transport chain - ETC*) i u oksigenazama koje nisu ovisne o hemu (24). Dakle, AIF i AIFM3 sadrže homologne domene i specifične domene, a mogu djelovati proapoptotski ili promicati preživljenje stanice. Različite su uloge i mehanizmi djelovanja posebnih apoptogenih i redoks domena na pro-apoptotičke i anti-apoptotičke aktivnosti (25).

Najnovijim istraživanjem *AIFM3* pomoću masene spektrometrije i bioinformatike, otkriveni su proteini povezani s njim. *AIFM3* stupa u interakciju s proteinom CAD (*engl. carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase*) (28). CAD katalizira jednu od početnih reakcija za *de novo* biosintezu pirimidinskih nukleotida koja je nužna za staničnu proliferaciju (29) i pronađen je u citoplazmi stanica bubrega hrčka (30).

#### 1.5.1.1. Apoptotska uloga AIF i AIFM3

Apoptoza je visoko regulirani način stanične smrti koji omogućava strogu kontrolu broja stanica, veličine tkiva i važna je za očuvanje homeostaze. Normalno se apoptoza odvija

tijekom razvoja i starenja, kada fiziološki umiru pojedinačne izolirane stanice. Apoptoza je važna jednako kao mitozu i pokazuje komplementarnu i suprotnu ulogu u proliferaciji stanica i regulaciji različitih staničnih populacija u tkivu. Apoptozom umiru stanice uslijed patoloških poticaja slabijeg intenziteta nego u nekrozi (31). Događaji ovise o organiziranoj indukciji izražaja određenih gena. Većinu karakterističnih morfoloških promjena uzrokuju proteaze nazvane kaspaze (32). Dva glavna apoptotička puta su vanjski (put receptora smrti) i intrinzični (mitohondrijski put). Postoji tzv. perforin/granzimski put koji inducira apoptozu pomoću granzima B ili granzima A iz NK stanica i citotoksičnih T limfocita (31,33). Sva tri puta apoptoze ovisna o kaspazama konvergiraju prema istom putu izvršenja. Taj put je pokrenut cijepanjem kaspaze-3 i rezultira fragmentacijom DNA, razgradnjom citoskeletnih i nuklearnih proteina, umrežavanjem proteina, stvaranjem apoptotičkih tjelešaca, izražajem liganada za fagocitne stanične receptore i konačno fagocitozom od strane makrofaga (32). Kontrolu i regulaciju apoptoze vrši obitelj proteina BCL-2, od kojih neki članovi inhibiraju, a neki aktiviraju proces apoptoze sprječavanjem ili poticanjem otpuštanja različitih pro-apoptotičkih proteina iz mitohondrija (34).

Mehanizam stanične smrti neovisan o kaspazi je specifična vrsta apoptoze koja uključuje mitohondrijske čimbenike poput AIF. U određenim patološkim uvjetima, AIF se treba translocirati iz mitohondrija u jezgru da stvori degradosom, DNA degradirajući kompleks s histonom H2AX, koji inducira kondenzaciju kromatina i raspadanje stanice (35). Molekularni mehanizmi pomoću kojih degradosom djeluje kao efektor smrti nisu jasni. Nuklearna translokacija AIF-a je koristan imunohistokemijski biljeg apoptoze koji se može primjeniti u analizi arhiviranog histološkog materijala uklopljenog u parafin (36).

S druge strane, AIFM3 se ne translocira u jezgru, već inducira klasičnu apoptotičku kaskadu ovisnu o kaspazi i posredovanu oslobađanjem citokroma c i aktivacijom kaspaze-3. Njegova Rieske domena inducira apoptozu i potiče lokalizaciju proteina u mitohondriju. AIFM3 stimulira staničnu smrt depolarizacijom membranskog potencijala mitohondrija, što povećava propusnost membrane ili oslobađa AIFM3 (24,36).

Tijekom razvoja nastaju *valovi apoptoze* u dvije regije. U medularnoj papili apoptoza dostiže vrhunac u rano postnatalno vrijeme, a u nefrogenoj zoni nekoliko dana prije rođenja, osobito među "viškom" MM stanica koje nisu bile inducirane u epitel nefrona. Na oba mjesta se za nekoliko dana apoptoza smanji s vršnih vrijednosti (37–39). Stoga se apoptoza može previdjeti ako histološke studije nisu dobro tempirane. Poremećaj apoptoze može uzrokovati

nepravilnosti građe ili bolest. *BCL-2* protoonkogen igra ključnu ulogu u zaštiti stanica od apoptoze. Izražen je u razvojnom bubregu i važan u kontroli diferencijacije epitela jer balansira broj stanica MM i stanica UB (40). Poremećena ravnoteža u miševa s nedostatkom *Bcl-2* dovodi do hipoplazije bubrega, nastanka cista i manjka nefrona (41).

#### 1.5.1.2. Uloge AIF i AIFM3 u oksidacijskoj fosforilaciji

U eukariota se oksidacijska fosforilacija (*engl.* oxidative phosphorylation - OXPHOS) odvija u mitohondrijima. U OXPHOS, elektroni podrijetlom iz NADH i FADH<sub>2</sub> reduciraju O<sub>2</sub> do vode. Visoko egzergona redukcija postiže se reakcijama prijenosa elektrona pomoću membranskih proteina respiracijskog lanca. Lanac se sastoji od četiri proteinska kompleksa ugrađena u unutarnju mitohondrijsku membranu, (Kompleksi I, II, III i IV) (42). AIF regulira OXPHOS i energetske homeostazu jer pomaže biogenezu i/ili stabilizaciju tih kompleksa (43). Nedavna studija na modelu miša potvrđuje da nedostatak AIF destabilizira mitohondrijski lanac prijenosa elektrona i izaziva dezorganizaciju superkompleksa, gubitak potencijala mitohondrijske transmembrane, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (*engl.* reactive oxygen species - ROS) i smanjenje aktivnosti Kompleksa I u različitim organima (44). AIF je ključni čimbenik za regulaciju diferencijacije i sudbine stanica. Slično AIF-u, ubikvitarni izražaj AIFM3 i njegova primarna lokalizacija u unutarnjoj mitohondrijskoj membrani i nešto manje u membrani endoplazmatskog retikuluma, ukazuje na njegovu tzv. domaćinsku ulogu (*engl.* housekeeping) u mitohondrijima. AIF štiti neurone od smrti jer sakuplja slobodne radikale (45). Prisutnost Rieske i Pyr\_redox domene u AIFM3 znači da može sakupljati slobodne radikale *in vivo* i osigurati preživljenje stanice (24). *AIFM3* je jedan od 9 gena na kromosomu 22q11.2 osjetljivih na ugnježđeno (*engl.* nested) atipično udvostručenje, koje je rizično za neurorazvojne fenotipove (46). *AIFM3* je izražen u mozgu čovjeka i *medaka* ribica (45,47). On je „sakupljač radikala“ koji utječe na pravilan razvoj i održavanje živčanog sustava. Navedene molekularne mehanizme trebalo bi temeljito istražiti jer mogu pridonijeti održavanju Kompleksa I u elektronskom transportnom lancu.

#### 1.5.1.3. Izražaj *AIFM3* u bubregu

Prema RT-qPCR i imunohistokemijskoj analizi, *AIFM3* mRNA i protein AIFM3 su ubikvitarni u humanim tkivima (24). Povećanje broja kopija *AIFM3* i prekomjerni izražaj su nađeni u nekoliko tipova raka, uključujući karcinom bubrega. Vrlo nizak izražaj je nađen u normalnom tkivu štitnjače, nadbubrežne žlijezde, prostate, jetre, pluća i drugih organa

(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), Tablica S3; Human Protein Atlas dataset (48)). Malo se zna o specifičnoj ulozi AIFM3 u bubrežima. Prema istraživanju Lopez i suradnika, *AIFM3* je jako izražen u urinarnom traktu fetusa i djece, pretežno u tubulima i slabo u glomerulima, pa potencijalna haploinsuficijencija *AIFM3* može pridonijeti ČAKUT-u (49). Istovremeno, *AIF* je jako izražen u citoplazmi epitela tubula (50).

Anomalije bubrega česte su i tipične u bolesnika s duplikacijama i delecijama 22q11.2. Anomalije genitourinarnog trakta, posebno bubrega nalaze se u 30-40% bolesnika s delecijama 22q.11.2 (49,51–54). Abnormalnosti uključuju hipoplaziju bubrega, displaziju, ciste, UPJO, PUV, dvostruki sustav prikupljanja, VUR, potkovasti bubreg i druge razvojne nepravilnosti (54–56). Novije istraživanje identificiralo je tri gena (*AIFM3*, *SNAP29* i *CRKL*) u 370 kb regiji 22q11.2 kao ključne za bubrežni fenotip DiGeorgeovog sindroma (22q11 delecijski sindrom). Studija genetskih interakcija provedena na zebricama pokazala je da delecija susjednih gena *aifm3* i *snap29* rezultira značajkama koje su konzistentne s fenotipom ČAKUT-a, samo uz ko-supresiju (49).

### 1.5.2. *CRKL* (engl. CRK like proto-oncogene, adaptor protein)

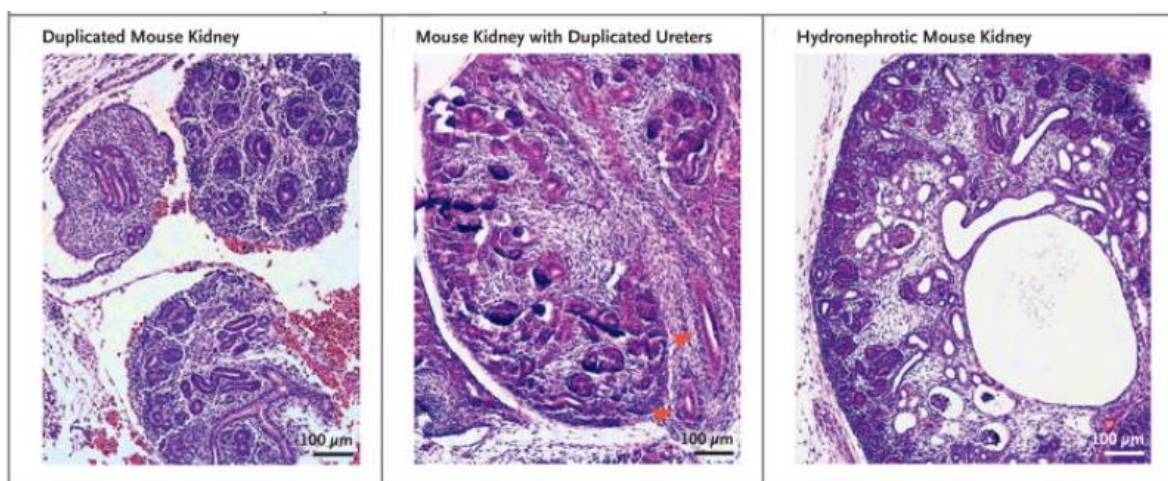
*CRKL* gen se nalazi na kromosomu 22, na q11 uz *AIFM3*, a kodira protein koji je član obitelji CRK proteina (57,58). Proteini CRK obitelji (CRK1/2 i CRKL) su ubikvitarni adapterski proteini koji imaju domene homologne sa Src i sudjeluju u biološkim procesima kao što su regulacija stanične morfologije, migracija stanica, proliferacija, diferencijacija i regulacija prepisivanja gena (59,60). Male adapterske molekule nemaju katalitičku aktivnost, ali sadrže domene SH2 i SH3 (engl. Src homology - SH) koje posreduju u interakciji proteina i igraju glavnu ulogu u prijenosu signala jer okupljaju komponente signalne kaskade (61). CRK proteini nisu samo kanali za spomenute putove, već kontroliraju amplitudu signalizacije.

CRKL sadrži jednu SH2 domenu i dvije SH3 domene koje se vežu na specifične tirozin-fosforilirane proteine p130, CAS, CBL i paksilin (60,62,63). Uz to, domene se vežu na proteine bogate prolinom BCAR1, GAB, ABL-1, Pax, GEF, C3G, BCR-ABL i SOS koji su bitni za pravovremeno stvaranje lokaliziranih kompleksa kritičnih za staničnu proliferaciju, adheziju i migraciju (58,64). CRKL ima funkciju u citosolu i jezgri. Može oblikovati određeni kompleks i translocirati se u jezgru, gdje se veže na tirozin-fosforilirani STAT5 i djeluje kao transkripcijski čimbenik (61,65,66). CRK i CRKL mogu stvoriti hetero-oligomer izravnom interakcijom preko C-terminalne SH3 domene (67).

Novija istraživanja pokazala su da je CRKL jako izražen u karcinomima debelog crijeva, želuca, jetre, gušterače, dojke, pluća, jajnika, mokraćnog mjehura, glave i vrata i u leukemiji, te je potencijalno ciljna molekula za razvoj nove terapije. Proteini iz obitelji CRKL povezani su s agresivnim ponašanjem tumora. CRKL regulira rast stanica, mobilnost, adheziju ovisnu o integrinu, proliferaciju stanice, progresiju staničnog ciklusa, preživljavanje stanica, invaziju i EMT, odnosno igra ključnu ulogu u tumorigenosti (58,64,68–79). U svijetlostaničnom karcinomu bubrega (ccRCC) prekomjerni izražaj CRKL pojačava zloćudnost tumorskih stanica i agresivno napredovanje (80).

### 1.5.2.1. Izražaj *CRKL* u bubregu

Ponavljajuća delecija od 370 kb na telomernom 22q11.2 lokusu povezana je sa sporadičnim CAKUT-om, te bubrežnom bolešću u DiGeorgeovom sindromu (81). U toj je regiji upravo *CRKL* gen ključan za nastanak bubrežnih fenotipova. Lopez i suradnici dokazali su ulogu *CRKL*-a gena u razvoju bubrega i urotrakta u ljudi, miševa i zebrića. *CRKL* je difuzno i blago prisutan u UB i derivatima MM u 6. tjednu razvoja humanog bubrega. U 21. tjednu, *CRKL* je prisutan samo apikalno u epitelu proksimalnih zavijenih tubula i sabirnih kanala. U zdravom bubregu ispitanika od 1,5 godine je nađena visoka razina *CRKL*-a u apikalnom dijelu epitela proksimalnih zavijenih tubula i sabirnih kanala i difuzni citoplazmatski izražaj u endotelu glomerula, podocitima, parijetalnom epitelu i distalnim tubulima. Za razliku od toga, u referentnoj literaturi - Human Protein Atlasu navodi se rijetki slabi točkasti izražaj *CRKL* u tubulima i glomerulima (82). Bubrezi miša u razvoju (E15.5.) pokazali su izražaj *Crkl*-a uglavnom u strukturama povezanim s UB i povremeno u SSB i proksimalnim tubulima u razvoju. U zebrića su primjenom protočne citometrije, sortiranja stanica i in situ hibridizacije potvrdili izražaj *crkl* u pronefrosu. Razina mRNA i *Crkl* u mišjem modelu s *Crkl* mutacijom pokazala je da izolirani *knockdown* i *knockout* rekapituliraju bubrežne anomalije bolesnika s DiGeorgeovim sindromom. Genska inaktivacija *Crkl*-a u mišjem modelu rezultirala je fenotipovima bubrega i urotrakta koji nalikuju kongenitalnim anomalijama u ljudi, kao što su obostrano podvostručenje bubrega, podvostručenje mokraćovoda, defekti grananja UB, displazija, hidronefroza, mikrocistični tubuli, dilatacija tubula i Bowmanova prostora. Neki bolesnici s izoliranim CAKUT-om imaju mutacije *CRKL* gena (49). Povezanost genotipa i fenotipa sugerira da su to varijante specifične za defekte parenhima, primjerice bubrežnu agenezu ili hipodisplaziju, a ne defekte mokraćovoda i donjeg mokraćnog sustava.



**Slika 4.** Razvojni fenotipovi bubrega i mokraćnog sustava koji podsjećaju na CAKUT u *Crkl knockout* miševa, a uključuju obostrano udvostručene bubrege, udvostručene mokraćovode i hidronefrozbu bubrega. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 50)

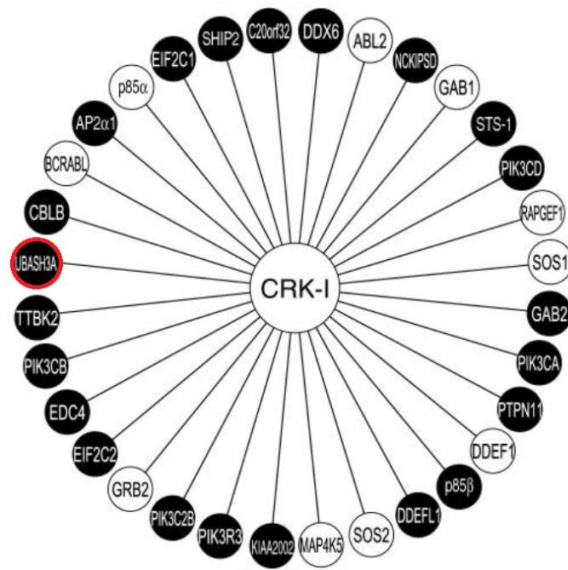
Nekoliko istraživanja je ukazalo na uključenost *CRKL* gena u morfogenezu podocita. U staničnoj kulturi, humani podociti izražavaju *CRKL* i *CRK1/2* proteine u citoplazmi i jezgri. Manjak *CRKL* i *CRK1/2* dovodi do oštećenja citoskeleta, utječe na staničnu adheziju, smanjuje migraciju, širenje i održivost stanica i mijenja signalne putove p130Cas, FAK, PI3K/Akt, p38 i JNK. Oštećenje uzrokovano *knockdown*-om *CRKL* i *CRK1/2* teže je nego pojedinačno oštećenje. Delecija *CRKL*-a ima blaži fenotip - tijela podocita postaju tanja i duža. Tirozinom fosforilirani nefrin regrutira *CRKL* za lamelipodijsku aktivnost. *CRK1/2* i *CRKL* imaju aditivni učinak na održavanje funkcija podocita i to upućuje na njihovu zajedničku funkciju – zajedno kontroliraju veličinu stanice, s tim da *CRKL* regulira produljenje stanice (62). Ti su zaključci u skladu s prethodnim studijama na fibroblastima i NK stanicama (83,84). Defekti u strukturi podocita i integritetu glomerularne FB su posljedica gubitka kritične hetero-oligomerne interakcije između *CRKL*, *CRK2* i nefrina na pukotinastoj opni (62). Specifične delecije *Crkl/2* ili *Crkl* u mišjim podocitima utječu na gubitak nožica podocita, a istodobna delecija *Crkl/2* i *Crkl* dovodi do albuminurije. Smanjene razine *CRK1/2* i *CRKL* su povezane s nekim glomerulopatijama u ljudi, što je imunohistokemijski dokazano u perkutanim biopsijama bubrega bolesnika s FSGS-om i MCD (67). *CRKL* je nizvodno od proteina *DAB1* u Reelin signalnom putu i tijekom razvoja mozga ima funkciju u pozicioniranju neurona (85). U prethodnim studijama pokazan je jaki izražaj *DAB1* u humanim fetalnim bubrezima (86), te hipoplaziji bubrega povezanoj s gubitkom nožica podocita u *Dab1<sup>-/-</sup>* miševa (87). Može se pretpostaviti da je CAKUT fenotip u *Dab1<sup>-/-</sup>* miševa vjerojatno povezan s neodgovarajućom aktivacijom *CRKL*-a.



### 1.5.3. *UBASH3A* (engl. ubiquitin associated and SH3 domain containing A)

*UBASH3A* gen je mapiran na kromosomu 21q22.3 i kodira istoimeni protein koji zajedno s *UBASH3B* pripada *UBASH3* obitelji proteina. Obitelj ima jedinstvenu arhitekturu domena, te sadrži N-terminalnu domenu koja veže ubikvitin (UBA), centralno smještenu SH3 domenu i C-terminalnu histidin fosfataznu domenu koja sadrži signal nuklearne lokalizacije. *UBASH3A* je prvi opisani protein koji sadrži i UBA i SH3 domene. Pokazano je da se UBA domena veže za monoubikvitin i ubikvitilirane proteine, uključujući proteine iz obitelji *UBASH3* kad su ubikvitilirani (86–91). SH3 domena proteina *UBASH3* obitelji posreduje u vezivanju na druge proteine, primjerice u interakciji s CBL-om (E3 ubikvitin ligaza) (88,91,92). Histidin fosfatazna domena ima sposobnost hidrolizacije niskomolekularnih supstrata fosfataze tj. proteina koji sadrže fosfotirozin i glavni su supstrati u fiziološkim uvjetima (93–97). Domena najbliža C-terminalnom kraju *UBASH3A* posreduje u dimerizaciji proteina, ali funkcionalna uloga oligomerizacije nije jasna (91,93,94).

BCR-ABL mreža protein-protein interakcija, opisana korištenjem tandemske afinitetnog pročišćavanja/MS analize, dala je mrežu molekularnih interakcija za stotinjak staničnih proteina. Mreža je otkrila visoki stupanj međusobne povezanosti 7 centralnih komponenti oko BCR-ABL, uključujući CRK I i njihove veze s različitim signalnim putevima. Iz dijagrama na Slici 5 može se vidjeti novootkrivena interakcija između *UBASH3A* i CRK I (98).



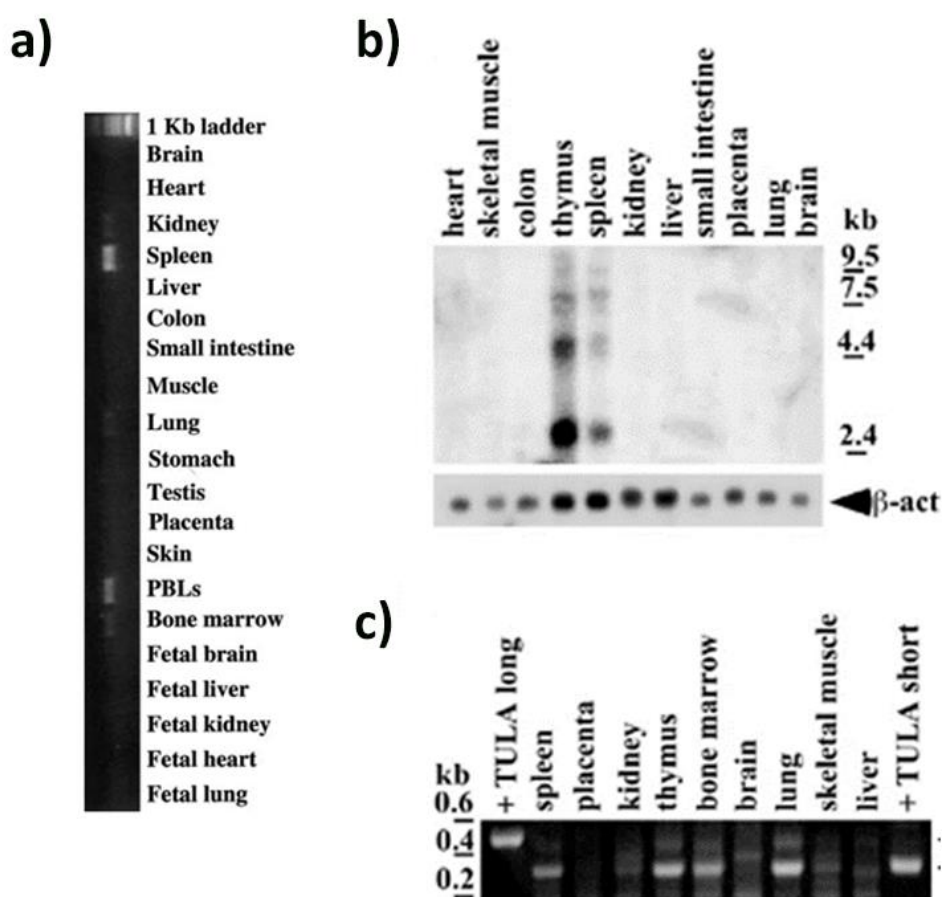
**Slika 5.** Mreža molekularnih interakcija CRKI dobivena tandemsko afinitetnim pročišćavanjem/MS. Identificirani interaktori su predstavljeni kao zvjezdasti dijagram s CRKI proteinom u sredini. Interaktori koji su bili prije poznati prikazani su kao bijeli krugovi, a crni krugovi predstavljaju potencijalne nove interakcije. UBASH3A je označen crvenom bojom. (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 99)

UBASH3A je negativni regulator aktivacije i funkcije T-limfocita (99,100). Važan je u kontroli odgovora T-stanica u bolestima koje karakterizira autoimuni i/ili kronični upalni odgovor. Bolesti povezane s određenim polimorfizmom pojedinačnih nukleotida UBASH3A su dijabetes tipa 1 (99,101–104), reumatoidni artritis (105), vitiligo (106), Gravesova bolest (102), celijakija (105), sistemski eritematozni lupus (107–109) i atopijski dermatitis (110). Na mišjim modelima istovremena delecija *Ubash3a* i *Ubash3b* uzrokuje hiperreaktivnost T-limfocita nakon antigene stimulacije njihovih receptora. Pojedinačni *knockout* miš se fenotipski ne razlikuje od miša divljeg tipa (111). Nedostatak UBASH3A jako utječe na funkciju T-limfocita i imunološki odgovor u fiziološkim i patološkim stanjima, ali molekularna osnova učinka UBASH3A na aktivaciju stanica i biološki odgovor još nije jasna.

Poznato je da bolesnici s Down sindromom (DS) imaju povećanu osjetljivost na virusne i bakterijske infekcije (112,113). S obzirom da je *UBASH3A* mapiran na kromosomu 21, njegov prekomjerni izražaj u trisomiji 21 mogao bi biti uključen u imunološke fenotipove DS.

### 1.5.3.1. Izražaj *UBASH3A* u bubregu

Ekspresija *UBASH3A* gena je ograničena na limfoidna tkiva, za razliku od njegovog paraloga *UBASH3B* koji je ubikvitaran (91,111,114). Urađen je PCR panel humane cDNA za proučavanje profila *UBASH3A* gena i semikvantitativno analiziran. Pronađen je u bubrezima, slezeni, plućima, leukocitima periferne krvi i koštanoj srži odraslih. S druge strane, u fetalnom tkivu bubrega, pluća, srca, mozga i jetre *UBASH3A* je bio negativan (Slika 6). Niska razina *UBASH3A* mRNA u plućima i bubrezima može se dokazati PCR metodom, ali ne i Northern blot metodom koja je slabije osjetljiva (88,115).



**Slika 6.** Analiza izražaja panela cDNA za humani *UBASH3A*: PCR (a) (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 89), Northern blot (b) i PCR (c) (Preuzeto i prilagođeno prema referenciji 116).

In vitro studije *knockdown*-a gena koje su proveli Jinwoo Ahn i suradnici otkrile su da je *UBASH3A* gen često mutiran u bolesnika sa ccRCC i predstavlja kandidat gen povezan s metastaziranjem. *Knockdown UBASH3A* značajno inhibira migraciju i vijabilnost stanica jer aktivira SYK čiji je izražaj povezan s pokretljivošću i migracijom. *UBASH3A* je povezan sa sinkronim metastazama u ccRCC veličine  $\leq 7$  cm (patološki stadij pT1) i mogao bi se koristiti kao potencijalni prognostički biljeg (116).

### 1.5.3.2. Uloga *UBASH3A* u apoptozi

*UBASH3A* se veže na AIF koji se oslobađa iz mitohondrija i translocira u jezgru u slučaju kad je stanica izložena stresu iz okoliša, a translokacija dovodi do apoptoze neovisne o kaspazi. U jezgri se *UBASH3A* veže na AIF koji je neophodan za njegov apoptotički učinak. *UBASH3A* je jedan od rijetkih funkcionalnih interaktora AIF-a. On pojačava apoptotske događaje ovisne o AIF-u, a nije neovisni induktor apoptoze. Navedeni učinak ovisi o njegovim UBA i SH3 domenama (117).

### 1.5.3.3. CAKUT u Down sindromu

CAKUT fenotip je četvrti po učestalosti prirođenih anomalija u DS (118). U ljudi s DS je tijekom života povećana učestalost bolesti bubrega i mokraćnog sustava. Uz to, veći je udio nedijagnosticiranih anomalija mokraćnog sustava. Djeca i adolescenti s DS imaju 30 puta veću prevalenciju CAKUT-a od opće populacije, koja iznosi 7,2%- 20% (118–120). Najučestaliji CAKUT fenotipovi u DS su nepravilnosti izljeva: VUR, PUV, UPJO, megareter; abnormalnosti broja bubrega: renalna ageneza; abnormalnosti veličine i morfologije bubrega: bubrežna hipoplazija, cistični displastični bubreg; abnormalnosti položaja bubrega: potkovasti bubreg i bubrežna ektopija (118–123). Smanjena veličina bubrega u DS primjećena je prije tri desetljeća. Dvije obdukcijske studije su dokazale smanjenje mase bubrega od 14,4%, odnosno 31,1% (119,121). Ultrazvučno mjerenje *in vivo* potvrdilo je da djeca s DS tijekom razvoja imaju značajno manje bubrege. Hipoplazija bubrega može dovesti do tubularnog zatajenja i defektnog koncentriranja mokraće. Smanjeni su klirensi kreatinina i mokraćne kiseline (120). S obzirom da je produljenje tubula najvažnije za postnatalni rast bubrega, smatra se da je nedovoljni postnatalni rast tubula odgovoran za sporije povećanje bubrega nakon dovršetka nefronogeneze (6). Broj glomerula u novorođenčadi s DS je 60% od normalnog (118). Nalaze se mikrociste u kori bubrega, nezreli glomeruli u dubokoj kori i nepravilni glomeruli (118).

Češće su glomerulopatije kao membranoproliferativni glomerulonefritis, imunotaktoidna glomerulopatija i FSGS. Te nepravilnosti zajedno upućuju na poremećaj razvoja urinarnog sustava, nefrogeneze i razvoja glomerula.

Zbog nedostatka potpunog uvida u uzroke CAKUT-a i učinak na bubrežnu funkciju, ograničene su dijagnostičke i terapijske mogućnosti za bolesnike s DS. Dodatne kopije gena na kromosomu 21 ometaju normalni razvoj i uzrokuju tipične značajke DS. Kromosom 21 je najmanji ljudski autosom i kodira približno 225 gena. Osobe s DS-om obično imaju tri kopije svih gena u svakoj stanici. Dodatne kopije gena nužno ne utječu na staničnu funkciju. Parcijalna trisomija 21. kromosoma uključuje regiju 21q22 koja je dovoljna za nastanak tipičnog DS fenotipa i kritična je za razvoj DS (124–127). Ne zna se je li složeni klinički fenotip u bolesnika s DS nastao radi neravnoteže doze gena, ili zbog razvojne nestabilnosti uzrokovane velikim brojem abnormalnih produkata gena ključnih za razvoj (126).

*UBASH3A* bi smogao biti kandidat gen za razvoj CAKUT fenotipova u DS, jer je mapiran na 21q22.3 koja je kritična regija za DS fenotip. Od >200 gena povezanih s CAKUT-om (14–16), *UBASH3A* gen je jedini smješten u kritičnoj regiji za DS.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

*In silico* analiza baze podataka dobivena sekvenciranjem cijelog genoma bolesnika s potvrđenim CAKUT-om, provedena u Irving Medicinskom centru Sveučilišta Columbia u New Yorku, SAD, uputila je na *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A* kao CAKUT kandidat gene. Prostorni i vremenski događaji koji dovode do CAKUT-a su kritični za fenotipove koji nastaju. Razine *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A* dinamički se prostorno-vremenski mijenjaju u različitim fazama razvoja bubrega, što ukazuje na njihovu ulogu tijekom razvoja i moguću ulogu u nastanku CAKUT-a.

Ciljevi:

1. Utvrditi i kvantificirati vremenski i prostorni izražaj *CRKL*, *AIFM3*, *UBASH3A* i *AIF* u razvojnim stadijima bubrega i postnatalno u humanom bubregu primjenom indirektno imunofluorescencije.
2. Usporediti vremenski i prostorni izražaj *AIFM3* i *AIF* u razvojnim stadijima i postnatalno u humanom bubregu primjenom dvostruke indirektno imunofluorescencije.
3. Ispitati i kvantificirati transkripciju mRNA *CRKL*, *AIFM3*, *UBASH3A*, *AIF* i *BCL2* gena metodom RT-qPCR.
4. Utvrditi prostorni izražaj *AIFM3* i *CRKL* u bubrezima i mokraćovodima djece s potvrđenim CAKUT-om koja su umrla u perinatalnoj i neonatalnoj dobi.
5. Utvrditi prostorni izražaj *UBASH3A* u bubrezima djeteta s DS i CAKUT fenotipom umrlog u perinatalnoj dobi.
6. Utvrditi prostorni izražaj *UBASH3A* u perkutanoj bubrežnoj biopsiji ispitanika s podocitopatijama FSGS-om i MCD-om.

### **3. METODE I MATERIJALI**



### **3.1. Prikupljanje tkiva i etička načela**

Biopsijski i obdukcijski uzorci bubrežnog tkiva uklopljeni u parafinski blok prikupljeni su iz arhive Odjela za patologiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split (u daljem tekstu Zavod). Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu odobrilo je provođenje istraživanja (broj dozvole: 2181-198-03-04-16-0024). Temeljni etički i bioetički principi (osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost) su poštovani prilikom provođenja istraživanja u skladu s Nirnberškim kodeksom i Helsinškom deklaracijom (World Medical Association Declaration of Helsinki - 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013). Mjerenje porođajne duljine i podaci o datumu zadnje menstruacije korišteni su za procjenu starosti ploda između 13. i 40. razvojnog tjedna (O’Rahilly 1972). U istraživanje su bila uključena 52 ispitanika: 13 plodova ili neonatusa obduciranih na Zavodu koji nisu imali prirodene malformacije i dijete umrlo u dobi 1,5 godine i obducirano na Zavodu, 28 djece s prirođenim CAKUT-om umrlih u perinatalnoj/ranoj postnatalnoj dobi i obduciranih na Zavodu i 10 ispitanika biopsiranih zbog nefrotskog sindroma i dijagnosticiranih kao FSGS i MCD. U djece je dijagnoza multiplih malformacija postavljena temeljem obdukcije i upisana u patoanatomsko izvješće: uključila je morfološke anomalije više organa/organskih sustava s jednim/više CAKUT fenotipova. U toj skupini bile su prepoznatljive malformacije poput Potter sindroma tip IIA, Edwards sindroma (trisomija 18) i Down sindroma (trisomija 21). Uzorci su se koristili isključivo za dobivanje znanstvenih rezultata.

### **3.2. Histološka analiza**

#### **3.2.1. Obrada tkiva za histokemijske metode**

Tkivo bubrega uzorkovano nakon obdukcije, odnosno biopsije, fiksirano je u 4%-tnoj otopini paraformaldehida puferiranoj na pH 7,0 fosfatnim solima (128). Dehidrirano je u gradijentu etanola i prožeto tekućim parafinom, te uklopljeno u parafinske blokove. Za potrebe imunohistokemije metode, iz blokova su izrezani histološki preparati debljine 5 µm i montirani na adhezivna predmetna stakalca.

#### **3.2.2. Hematoksilin i eozin metoda**

Za rutinsku histološku analizu preparati su obojeni H&E metodom (129) i analizirani svjetlosnim mikroskopom, kako bi se mogla potvrditi prethodno postavljena dijagnoza i

procijeniti očuvanost tkiva prije imunofluorescentnog bojenja. Svaki deseti rez obojen je H&E metodom tako da je preparat najprije deparafiniran u ksilolu, potom rehidriran u gradijentu alkohola i destiliranoj vodi i onda obojen hematoksilinom 3x 1 minuta. Ispran je u alkalnoj vodi, obojen Eozinom Y 1x 5 minuta, diferenciran u gradijentu etanola, izbistren u ksilolu i poklopljen medijem za pokrivanje i predmetnicom. Svi preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51, Tokyo, Japan).

### 3.2.3. Indirektna imunohistokemija

Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije u etanolu i destiliranoj vodi, preparati debljine 5  $\mu\text{m}$  kuhani su u citratnom puferu 30 minuta na 95°C radi demaskiranja antigena. Nakon toga ohlađeni su u PBS-u i aplicirano je razrijeđeno primarno protutijelo: anti-AIFM3, anti-AIF, anti-UBASH3A, odnosno anti-CRKL (Tablica 1). Inkubacija u vlažnom i tamnom prostoru trajala je preko noći. Sljedeći dan su preparati isprani u PBS-u i tretirani odgovarajućim sekundarnim protutijelima obilježenim fluorescentnom tvari, te inkubirani 1 sat u tamnom i vlažnom prostoru. Poslije inkubacije preparati su isprani PBS-om i aplicirana je boja DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) koja kontrastira kromatin. Nakon ispiranja, primijenjen je Immumont i montirana pokrovica. Mikrofotografije su snimljene prilikom mikroskopiranja uzoraka na fluorescentnom mikroskopu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) opremljenim fotoaparatom Nikon DS-Ri1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) i slike obrađene pomoću Adobe Photoshopa. Negativna kontrola su bili preparati na koje nije bilo aplicirano primarno protutijelo.

**Tablica 3.** Upotrijebljena primarna i sekundarna protutijela

Protutijelo	Domaćin	Razrijeđenje	Serijski broj i proizvođač
anti-CRKL	kunić	1:50	HPA001100; Sigma-Aldrich, Germany
anti-AIFM3	kunić	1:500	TA 306550; Origene, USA
anti-AIF	ovca	1:500	AF5824; R&D Systems, USA
anti-UBASH3A	kunić	1:800	sc-121; Santa Cruz, USA
Alexa Fluor 488 AntiRabbit	magarac	1:400	711-545-152; Jackson ImmunoResearch, UK
Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Anti-Goat	magarac	1:400	705-295-003; Jackson ImmunoResearch, UK

### 3.2.3.1. Analiza razvojnih faza bubrega i kvantifikacija izražaja

Za istraživanje razvojnih faza humanog bubrega analizirani su preparati bubrega 11 fetusa u različitoj gestacijskoj dobi, preparati bubrega dva neonatusa i bubreg djeteta bez prirođenih malformacija umrlog u dobi 1,5 godina. Bilo koja razina bojenja vrednovana je kao pozitivna, a nedostatak bojenja kao negativna. Imunofluorescentni izražaj proteina AIFM3, AIF, UBASH3A i CRKL je kvantificiran na dva načina. Rezultati su izraženi kao postoci površine prekrivene pozitivnim signalom (PPPPS) i kao RAW score. Uzorci su podijeljeni prema četiri faze razvoja bubrega: prva faza (Ph1), faza dva (Ph2), faza tri (Ph3), četvrta prenatalna faza (Ph4 pre), četvrta faza 1 mjesec nakon rođenja (Ph4 1 M) i četvrta faza 1,5 godina nakon rođenja (Ph4 1,5 Y).

U PPPPS metodi kvantifikacije analizirano je u 15 reprezentativnih mikrofotografija fetalne ili postnatalne bubrežne kore svakog ipitanika. Slikana su nepreklapajuća vidna polja u identičnom vremenu ekspozicije pri povećanju 400x kako bi se izračunati PPPPS-ovi mogli uspoređivati. Pozitivan izražaj proteina CRKL, UBASH3A i AIFM3 vizualiziran je kao zeleni fluorescentni signal, točkasti ili difuzni, u jezgri odnosno citoplazmi. U dvostrukoj imunofluorescenci AIFM3 je bio obilježen zelenim, a AIF crvenim signalom.

Za kvantitativnu procjenu stanične imunoreaktivnosti korišten je ImageJ softver (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Slike su pripremljene za analizu oduzimanjem srednjeg filtra i određivanjem praga za mjerenje postotka površine presjeka pokrivenog pozitivnim signalom. Kolokalizacija AIFM3 i AIF-a je izračunata dijeljenjem površine njihovog preklapanja s kombiniranom površinom pomoću Adobe Photoshopa. Za statističku analizu korišten je softver GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD) i razina vjerojatnosti  $p < 0,05$  određena kao statistički značajna. One-way ANOVA test s Tukeyjevim post-hoc testom korišten je za usporedbu izražaja analiziranih biljega, kako bi se utvrdile značajne razlike među razvojnim fazama.

Za određivanje postotka stanica s pozitivnim izražajem proteina CRKL, AIFM3, AIF i UBASH3A posebno su analizirani: potpuno diferencirani glomeruli (G), proksimalni zavijeni tubuli (PCT), distalni zavijeni tubuli (DCT), nezreli glomeruli (IG), tijela u obliku slova S (SSB), tijela u obliku zareza (CSB) i bubrežni mjehurić (RV). Evaluirani tubuli su bili smješteni u vanjskoj kori. ImageJ softver je korišten za brojanje pozitivnih signala i postotak pozitivnih stanica izražen po svakoj analiziranoj strukturi. Intenzitet bojenja stupnjevan je kao 0 - odsutnost bilo kakve fluorescencije; 1- slab; 2- umjeren; i 3- jak.

RAW score je umnožak postotka pozitivnih stanica (PS) u određenoj strukturi u bubrežnoj kori (DCT, PCT, G, IG, SSB, CSB, RV) i intenziteta bojenja (IS):

$$RAW = IS * PS (\%)$$

RAW vrijednosti su bile u rasponu od 0 do 300. U svakom uzorku je analizirano najmanje 20 istih struktura. RAW vrijednosti navedenih struktura analizirani su u četiri faze razvoja bubrega. Dovoljno razvojnih struktura (IG, SSB, CSB i RV) imale se samo prve tri faze. Svi podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SD i analizirani two-way ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD). Razina vjerojatnosti  $p < 0,05$  uzeta je kao statistički značajna.

### 3.2.3.2. CAKUT

Preparati bubrega i/ili mokraćovoda 21 perinatalno ili neonatalno umrle djece s CAKUT fenotipovima tipičnima za sindrom delecije 22q11(51–56,81) ili *Crkl*<sup>-/-</sup> miševe (49) obojeni su imunofluorescentnom metodom i uspoređeni sa kontrolom, kako bi se utvrdilo jesu li prostorni i vremenski obrasci AIFM3 i CRKL u djece s CAKUT-om drugačiji. Ukupno je analizirano 28 uzoraka uklopljenih u parafin (Tablica 4).

**Tablica 4.** Podaci o uzorcima tkiva s dijagnosticiranim CAKUT-om.

<b>CAKUT fenotip</b>	<b>Dob</b>	<b>Gestacijska dob</b>	<b>Spol</b>
Policistična displazija bubrega, B	mrtvorodeno	35 w	m
Policistična displazija bubrega, B	mrtvorodeno	35 w	m
Policistična displazija bubrega, D Dilatiran mokraćovod, B	23 h	27 w	m
Displazija i hipoplazija bubrega, B	1 d	NP	ž
Displazija i hipoplazija bubrega, B	4 h	38 w	ž
Displazija bubrega, B Megaureter, D	mrtvorodeno	21 w	m
Displazija bubrega, L Dvostruki mokraćovod, L Ageneza bubrega, D	12 d	NP	m
Displazija bubrega, L	4 h	39 w	m
Policistična displazija bubrega, B	1 h	28 w	ž
Policistična displazija bubrega, B	14 h	35 w	m
Hipoplastični bubreg, D	mrtvorodeno	28 w	m
Hipoplastični bubreg, L	mrtvorodeno	NP	m
Ageneza bubrega, D	mrtvorodeno	21 w	m
Dvostruki mokraćovod, D	mrtvorodeno	23 w	ž
Dvostruki mokraćovod, L	4 h	30 w	m

Dvostruki mokraćovod i nakapnica, B	mrtvorodeno	40 w	ž
Potkovasti policistični bubreg Megaureter, D Edwardsov sindrom	5 d	NP	m
Potkovasti bubreg Edwardsov sindrom	mrtvorodeno	26 w	m
Potkovasti bubreg Edwardsov sindrom	25 h	30 w	m
Potkovasti bubreg Edwardsov sindrom	mrtvorodeno	34 w	m
Potkovasti bubreg Edwardsov sindrom	NP	NP	m

B – bilateralno zahvaćeno, D – zahvaćena desna strana, L – zahvaćena lijeva strana, w – tjedan, NP – nije primjenjivo.

### 3.2.3.3. FSGS i MCD

Bioptički uzorak pet ispitanika s FSGS-om i pet ispitanika s MCD-om su obojeni imunofluorescentnom metodom i uspoređeni s kontrolom kako bi se utvrdilo mijenja li se razina i lokalizacija UBASH3A u ispitanika s podocitopatijom.

### 3.2.3.4. Down sindrom

Za imunofluorescencijsko bojenje UBASH3A u trisomiji 21, analizirano je bubrežno tkivo prematurusa (33. razvojni tjedan) s dijagnosticiranim DS i CAKUT-om. Opisani CAKUT fenotip je bio bilateralna policistična displazija s bilateralnim megaureterom.

## 3.3. Izolacija RNA i RT-qPCR

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR) je primjenjena, osjetljiva i specifična metoda za otkrivanje i kvantifikaciju transkripcije mRNA. Smatra se *medium-throughput* tehnikom zbog potencijala za analizu više od jednog transkripta istovremeno. Kod RT-qPCR-a se akumulacija produkata amplifikacije kontinuirano utvrđuje tijekom reakcije mjerenjem povećanja fluorescencije izazvanog vezanjem fluorescentnih boja s PCR produktom (130,131). Fluorescentni signal raste proporcionalno s akumulacijom PCR produkta. Može se generirati standardna krivulja koja prikazuje fluorescenciju u odnosu na broj ciklusa. Prag ciklusa (Ct) je broj ciklusa potrebnih da fluorescentni signal reakcije prijeđe prag. Uspjeh u analizi izražaja gena ovisi o prikladnosti dizajniranih početnica. Kako bi se minimalizirale pogreške, primijenjene su razne strategije normalizacije, uključujući normalizaciju qPCR podataka prema veličini uzorka, volumenu tkiva i korištenju referentnih gena sa stabilnim izražajem kao interne kontrole (132–134). *Housekeeping* geni su idealni referentni geni jer su konstitutivni, potrebni za osnovnu staničnu funkciju i izraženi u većini stanica u fiziološkim uvjetima (135). Referentni geni su nužni kad su rezultati izraženi kao relativne veličine primjenom  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metode (136).

U skupini fetalno i neonatalno umrle djece bez prirođenih anomalija, izolirana je RNA iz uzoraka bubrega fiksiranih u parafinu. Sterilno izrezani rezovi debljine 20  $\mu\text{m}$  stavljeni su u tubicu, deparafinirani ksilolom i centrifugirani na 14 000 rpm 2 minute. Dobiveni talog je tretiran po priloženim uputama proizvođača GenElute™ FFPE RNA Purification Kit (Sigma-Aldrich, Germany). Nakon deparafiniranja je uzorak ispiran ksilolom i etanolom, te slijedi

razgradnja proteinazom K u odgovarajućem puferu A. Zatim se lizatu doda pufer RL i etanol i otopina nanese na spin-kolonu. Vezana RNA se ispere sa stupaca upotrebom otopine za pranje A. Nakon izolacije RNA, reverzna transkripcija se izvede korištenjem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Master mix koji sadrži cDNA, odabrane lijeve i desne početnice, detektor SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA) i vodu bez nukleaza miješa se i stavi u ploču s 96 jažica. Početnice korištene kod RT-qPCR metode (Tablica 5) su dizajnirane pomoću Primer-BLAST softwera (NCBI, USA) koji koristi Primer3 za dizajniranje PCR primera i BLAST za screening početnica prema određenoj bazi podataka kako bi se izbjegli parovi početnica koji mogu uzrokovati nespecifične amplifikacije (137). Svi uzorci su napravljeni u duplikatima, a RPS9 korišten kao referentni gen. Negativna kontrola je sadržavala sve osim cDNA. Ploča je zatim analizirana pomoću Applied Biosystems™ 7500 RT-PCR sustava.

**Tablica 5.** Početnice korištene u RT-qPCR metodi dizajnirane pomoću Primer-BLAST softvera (NCBI, USA).

<b>Gen</b>	<b>Lijeva početnica</b>	<b>Desna početnica</b>
<i>CRKL</i>	5'-AGC AAT CCA GAA AAG AGT ACC C-3'	5'-TTC ACT TCG CCT TCC CAC-3'
<i>AIFM3</i>	5'-CAA CCG CAA AGT GAACAT TCC-3'	5'-TCC AGA GGT AGG GCA CAG-3'
<i>AIF</i>	5'-AAG CAG GCTCTAACA TCT GG-3'	5'-TTC TCC AGC CAA TCT TCC AC-3'
<i>BCL2</i>	5'-GTG GAT GAC TGA GTA CCT GAA C-3'	5'-GCC AGG AGA AAT CAA ACA GAG G-3'
<i>UBASH3A</i>	5'-GAA TGG ACA AAA TGG GAA GCT G-3'	5'-TGT ACT CCT GGT AGC TCT CG-3'
<i>RPS9</i>	5'-GGA TTT CTT AGA GAG ACG CCT G-3'	5'-GGA CAA TGA AGG ACG GGA TG-3'



## **4. REZULTATI**

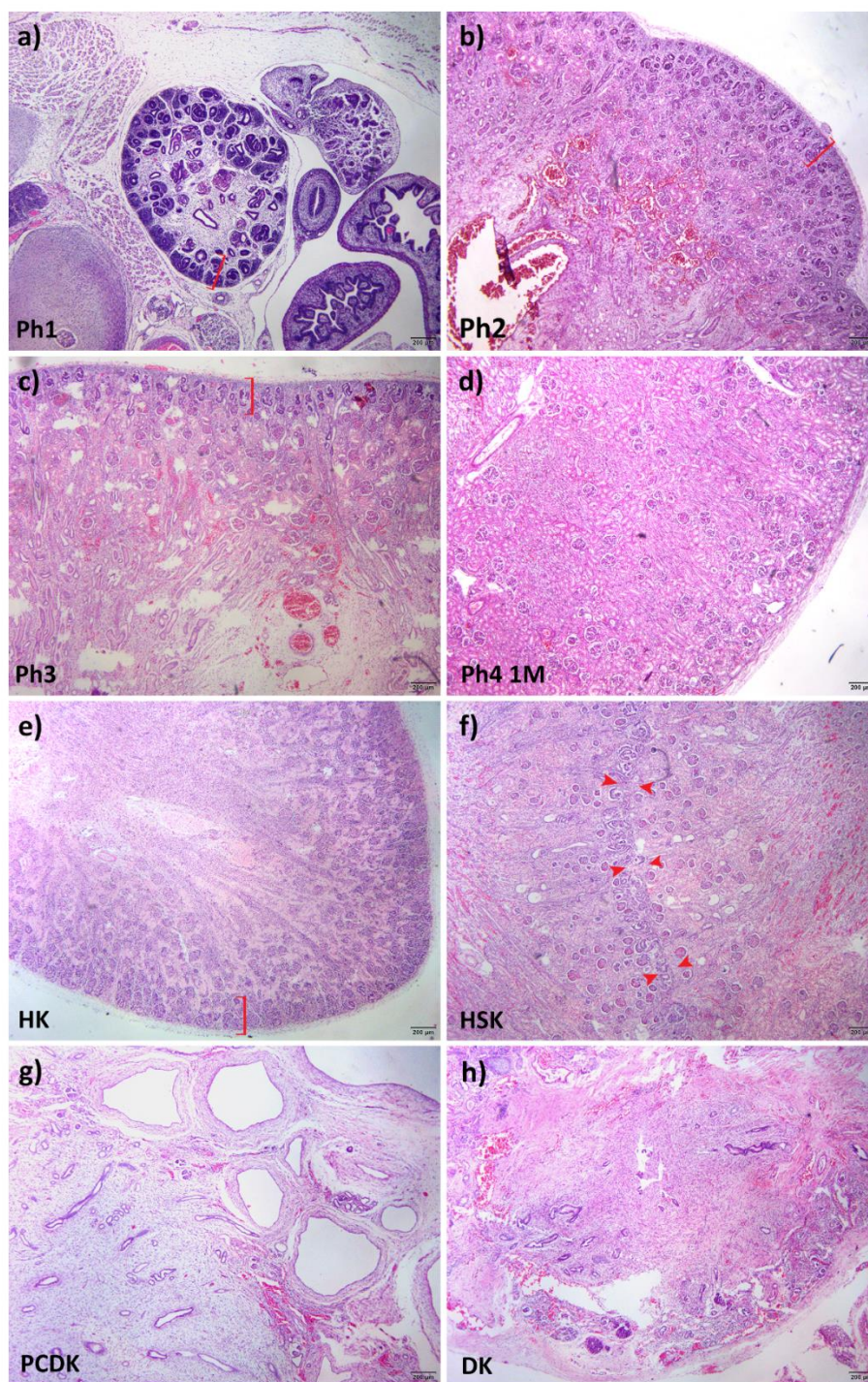
#### 4.1. Histološka analiza uzoraka bojanih H&E metodom

Analizom H&E preparata potvrđeno je da su ispitivana tkiva svih uzoraka dobro očuvana, a patohistološke dijagnoze korektne. U bubrezima bez morfoloških abnormalnosti se jasno razaznaju kora i srž (Slika 8; a, b, c, d, e, f). Uzorci u fazi Ph1, Ph2 ili Ph3 su imali prepoznatljivu nefrogenu zonu s nezrelim strukturama nefrona (Slika 8; a, b, c, e, f). Bubrezi u fazi Ph4 imali su samo zrele strukture nefrona u kori.

Hipoplastični bubrezi su bili abnormalno mali ( $<2$  SD ispod očekivane srednje vrijednosti povezano s dobi ili pokazateljima somatskog rasta), normalne morfologije i smanjenog broja nefrona (Slika 8; e).

Potkovasti bubrezi su imali funkcionalnu bubrežnu masu i normalnu histologiju. Zona fuzije dva bubrega bila je u središnjoj liniji i sastavljena od bubrežnog parenhima (Slika 8; f). U jednog su ispitanika potkovasti bubrezi bili policistični.

Policistični displastični bubrezi su potvrđeni kao Potter tip IIA za kojeg su karakteristične velike ciste u kori koje nastaju deformacijom ampule, povećana količina veziva i odsustvo normalnih sabirnih kanala i nefrona. Stijenke cista su bile građene od veziva i obložene niskim jednorednim epitelom. Između cista nalazilo se ostatno tkivo bubrega s brojnim primitivnim tubulima obloženima kubičnim do cilindričnim epitelom i okruženih vezivnomišićnim tkivom i umnoženim rahlim mezenhimom (Slika 8; g). U displaziji bubrezi ne prolaze odgovarajuću diferencijaciju i zato se nalaze malformirane strukture s nezrelim kanalićima koncentrično okruženima mezenhimom (Slika 8; h).

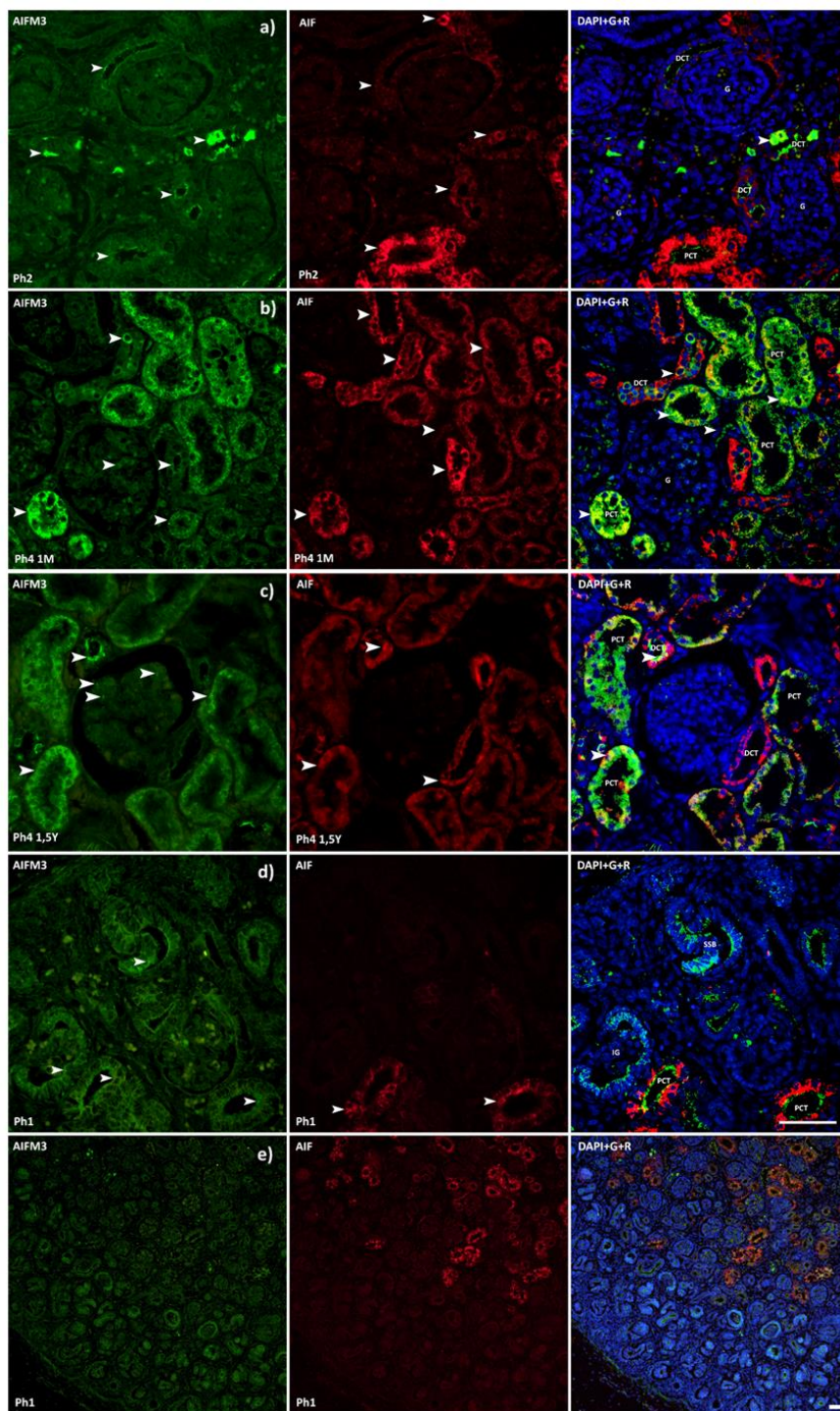


**Slika 8.** H&E bojenje humanih bubrega i bubrega s CAKUT fenotipom. **a)** Embrionalni bubreg (10w, Ph1) s naznačenom zonom nefrogeneze (crvena zagrada). **b)** Fetalni bubreg (16w, Ph2) s lobulacijom bubrega i naznačenom nefrogenom zonom (crvena zagrada). **c)** Fetalni bubreg (24w, Ph3) s nefrogenom zonom (crvena zagrada). **d)** Neonatalni bubreg (starosti jedan mjesec, Ph4 1M) u kojem su se prestali stvarati novi nefroni pa nema nefrogene zone. **e)** Hipoplastični fetalni bubreg (28w, HK) s vidljivom nefrogenom zonom (crvena zagrada). **f)** Potkovasti fetalni bubreg (34w, HSK) sa zonom fuzije i nefrogenim zonama (crvene strelice). **g)** Policistična displazija bubrega Potter tip IIA (35 w, PCDK) s brojnim kortikalnim cistama obloženim niskim jednorednim epitelom. Između cisti su brojni primitivni tubuli obloženi kubičnim do cilindričnim epitelom i okruženi vezivno mišićnim tkivom, te umnoženi rahli mezenhim. **h)** Displastični fetalni bubreg (21 w, DK) s nezrelim kanalićima koncentrično okruženima mezenhimom. Mjerilo je 200  $\mu$ m.

## 4.1. *AIFM3*

### 4.1.1. Kvantitativna analiza izražaja *AIFM3* i *AIF* po razvojnim fazama bubrega

Kvantitativna analiza razina proteina *AIFM3* i *AIF* je provedena na uzorcima zdravog bubrega u 13., 16., 21., 27., 29., 37. i 38. tjednu razvoja, te u postnatalnih uzoraka starosti 1 mjesec i 1,5 godina imunofluorescentnom metodom (Slika 9). Glavne mjere ishoda su bile PPPPS, RAW score i  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Pozitivan signal *AIFM3* bio je zrnato do difuzno citoplazmatsko/luminalno bojanje u PCT, DCT, glomerulu, Henleovoj petlji i sabirnim kanalima (Slika 9). Prve tri faze razvoja bubrega se podudaraju u intenzitetu i lokalizaciji *AIFM3*. Lokalizacija je bila luminalna u razvojnim strukturama, DCT i PCT. U tim fazama su pojedinačne stanice DCT-a pokazale jači intenzitet signala od stanica drugih pozitivnih struktura (Slika 9; a). U prenatalnoj Ph4 PCT-ovi su pokazali jako zrnato do difuzno citoplazmatsko bojanje. Nije uočena razlika u lokalizaciji i intenzitetu signala između postnatalnih faza i prenatalne Ph4. Prenatalna Ph4 i Ph4 1M su pokazale slabi signal u glomerulima za razliku od prethodnih faza. U DCT bilo je pojedinačnih pozitivnih stanica, ali se intenzitet nije razlikovao od ostalih struktura (Slika 9; b). Glomeruli u Ph4 1.5Y su imali značajno više pozitivnih stanica (Slika 9; c). Razvojne strukture nefrona nisu imale pozitivan signal *AIF* ni u jednoj fazi, za razliku od *AIFM3* koji je bio jako pozitivan u svim fazama (Slika 9; d,e). U srži su u svim fazama bile jako pozitivne stanice sabirnih kanala i nešto manje, stanice Henleove petlje (Slika 9). U Ph1 i Ph2, su stanice PCT pokazivale jaku imunoreaktivnost *AIF* vidljivu kao crveni signal u citoplazmi, a epitel DCT umjereni apikalni signal (Slika 9; a). Međutim, u Ph3 i Ph4 prenatalno DCT su imali sličnu raspodjelu imunoreaktivnosti kao PCT.

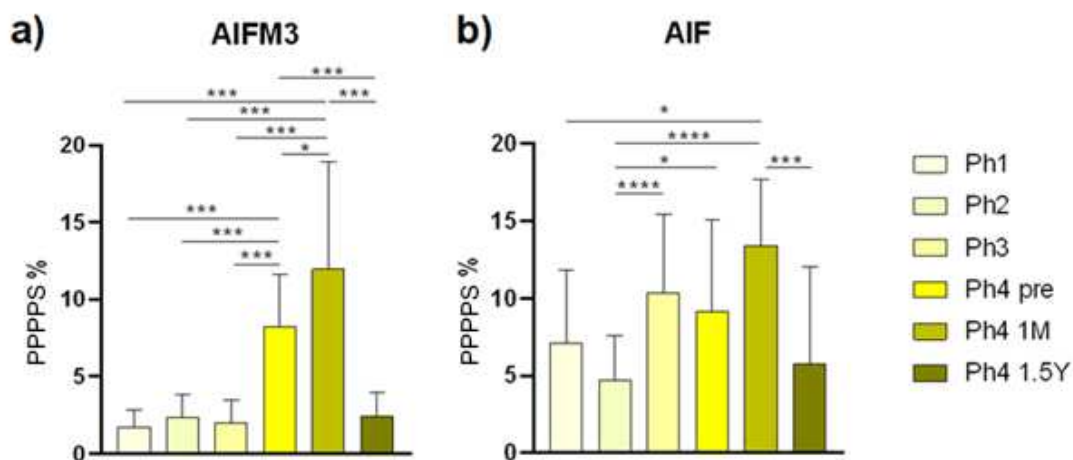


**Slika 9.** Imunofluorescentno bojenje fetalnih (a, d, e) i postnatalnih (b, c) humanih bubrega s AIFM3 (zeleno) i AIF (crveno) i njihova ko-ekspresija s DAPI nuklearnim bojenjem. Izražaj proteina AIFM3 i AIF (strelice), glomeruli (G), proksimalni zavijeni tubuli (PCT), distalni zavijeni tubuli (DCT), nezreli glomeruli (IG) i tijela u obliku slova S (SSB). Ko-ekspresija AIF-a i AIFM3 (strelice) na spojenim fotografijama vidi se kao žuta boja. Slike a, b, c i d snimljene su uz povećanje od 40 $\times$ , dok je e snimljena na 10 $\times$ . Mjerilo je 40  $\mu$ m. (a) Prve tri faze razvoja bubrega se podudaraju u intenzitetu i lokalizaciji AIFM3. Prikazana je Ph2. Pojedinačne stanice DCT-a imaju jaki intenzitet signala. (b) Ph4 prenatalna i Ph4 1M imaju veći PPPPS nego prve tri faze, a u glomerulima slabi signal. Nema razlike u lokalizaciji i intenzitetu signala između postnatalnih faza i prenatalnog Ph4, slika iz Ph4 1M. (c) Ph4 1.5Y je značajno slabije pozitivna od Ph4 prenatalne i Ph4 1M, a glomeruli imaju više pozitivnih stanica. (d,e) Razvojne strukture nefrona nisu pokazale prisutnost AIF, za razliku od AIFM3 koji je jako pozitivan.

### a) PPPPS

Kod analize AIFM3, aritmetičke sredine PPPPS (area %) svih analiziranih faza razvoja bubrega nisu prelazile 12%, a u Ph1, Ph2, Ph3 i Ph4 1.5Y ni 2.5%. Ph4 prenatalna i Ph4 1M su pokazale znatno veće vrijednosti PPPPS nego prve tri faze ( $p < 0.001$ ), a Ph4 1.5Y je imala značajno manje vrijednosti od prenatalne Ph4 i Ph4 1M ( $p < 0.0001$ ). U usporedbi postotka pozitivne površine između prenatalne Ph4 i Ph4 1M, druga je imala znatno veći PPPPS ( $p < 0,05$ ) (Slika 10, a).

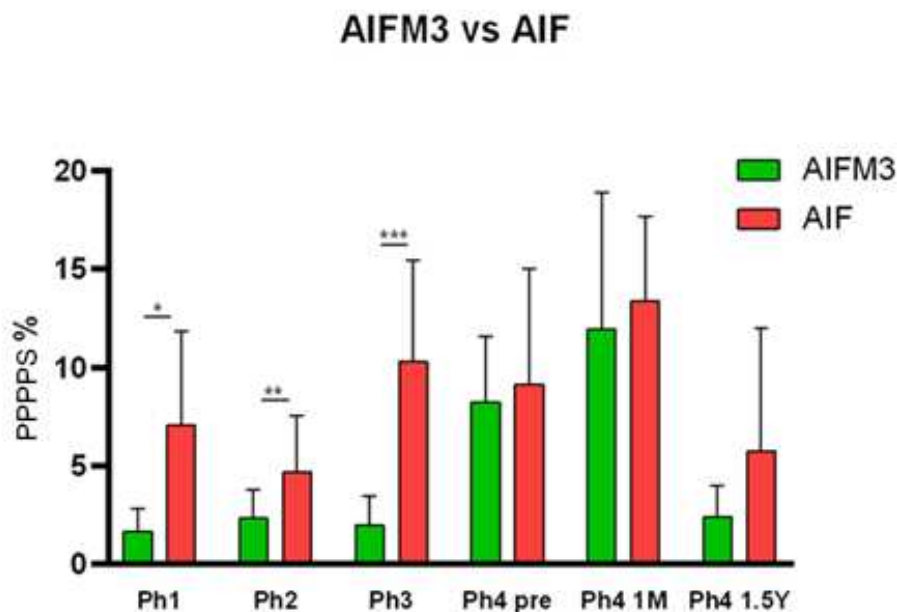
Rezultati analize PPPPS AIF-a su pokazali značajno manji postotak pozitivne površine u Ph2 od Ph3 ( $p < 0,001$ ), prenatalne Ph4 ( $p < 0,05$ ) i Ph4 1 M ( $p < 0,001$ ). Dodatno, Ph4 1 M je imala značajno veće područje pozitivnosti od Ph1 ( $p < 0,05$ ) i Ph4 1,5 Y ( $p < 0,001$ ) (Slika 10, b).



**Slika 10.** PPPPS AIFM3 (a) i AIF (b) u fetalnoj i postnatalnoj kori humanog bubrega.

Prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, godinu i pol nakon rođenja (Ph4 1,5 Y). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina PPPPS-a (area %)  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani jednosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Razlike između AIFM3 i AIF-a, analizirane su dvosmjernom ANOVA analizom s podacima o postotku njihovih površina. Više je AIF u Ph1 ( $p < 0,05$ ), Ph2 ( $p < 0,01$ ) i Ph3 ( $p < 0,001$ ) (Slika 11).

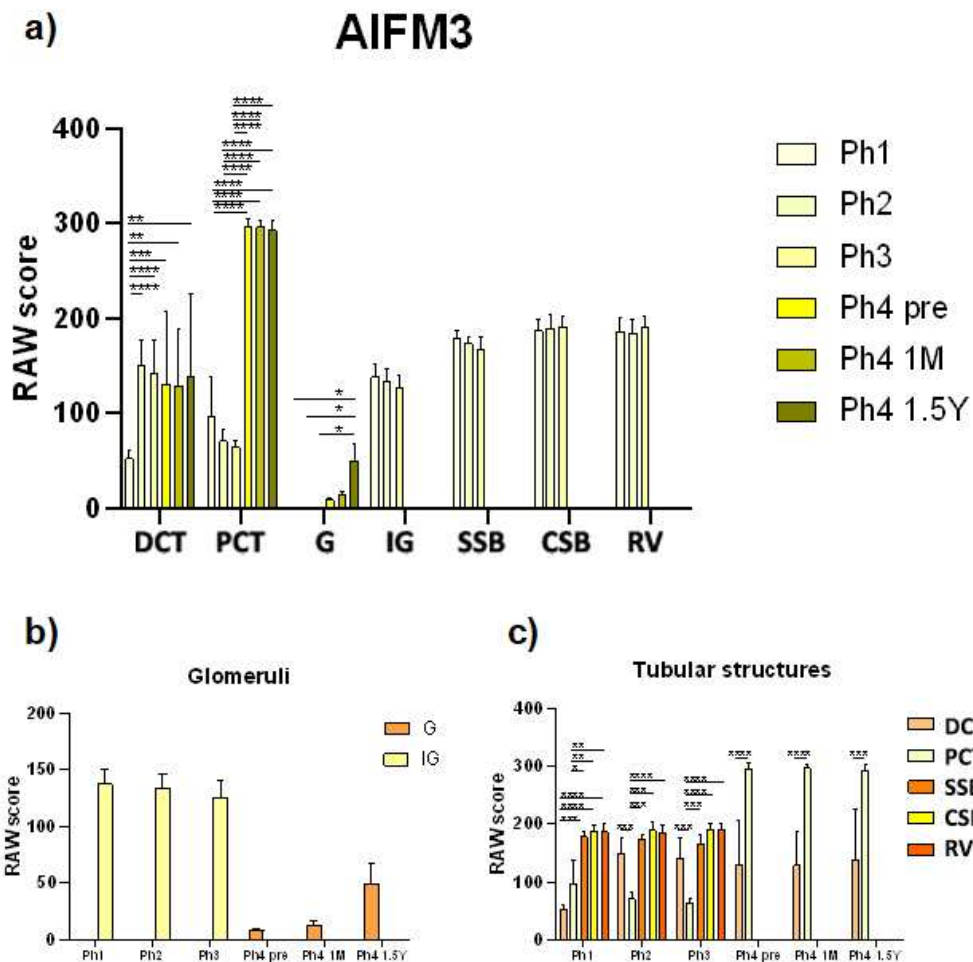


**Slika 11.** Usporedba PPPPS AIFM3 i AIF-a u fetalnoj i postnatalnoj kori humanog bubrega.

Prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, godinu i pol nakon rođenja (Ph4 1,5 Y). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## b) RAW score

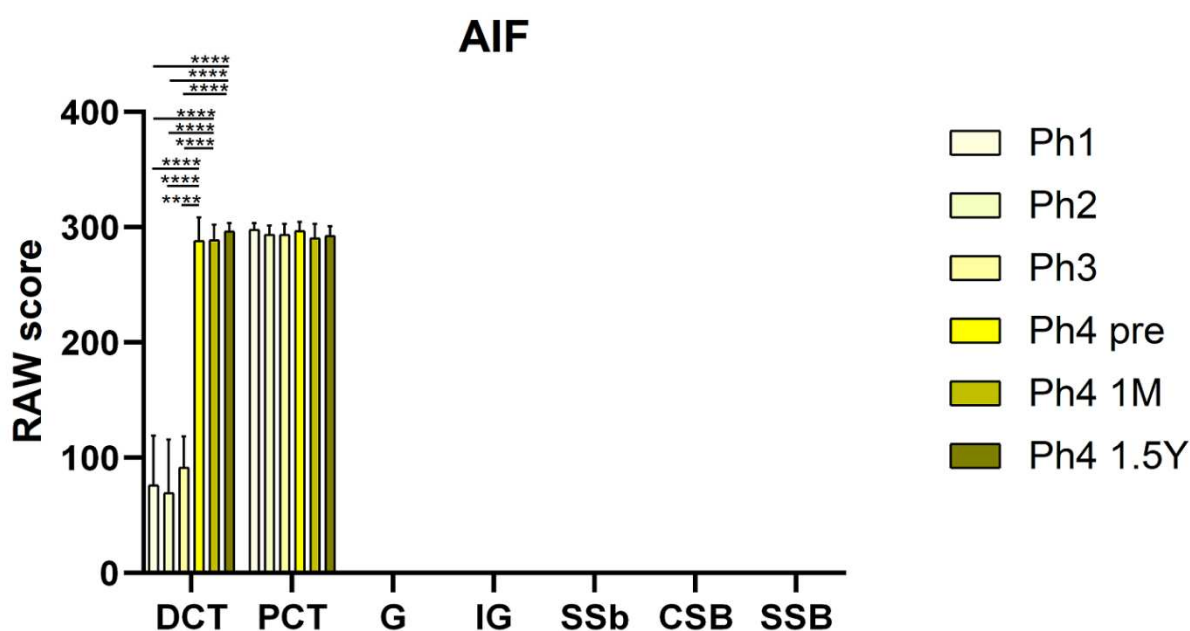
Uzorci koji su pripadali Ph1 su imali umjereni intenzitet AIFM3, osim pojedinačnih stanica DCT-a koje su pokazale jaki intenzitet signala. RAW vrijednost DCT-a u Ph1 je bila značajno manja u usporedbi sa svim sljedećim fazama. U skladu s PPPPS, PCT-ovi koji su pripadali prvim fazama (Ph1, Ph2, Ph3) su bili manje pozitivni od Ph4, pre- ili postnatalno ( $p < 0,0001$ ) (Slika 12, a). Druga i treća faza razvoja bubrega uglavnom su odgovarale Ph1 po lokalizaciji i intenzitetu (Slika 12, a). Glomeruli faze Ph4 1.5 su imali više pozitivnih stanica ( $p < 0,05$ ) (Slika 12, a). Postoje značajne razlike u izražaju AIFM3 između DCT-a i PCT-a u svim fazama osim u Ph1 (Slika 12, c). U Ph2 i Ph3, PCT su imali manji izražaj ( $p < 0,001$ ), a RAW vrijednosti PCT struktura u svim Ph4 razdobljima su bile veće nego u DCT (Slika 12, c). Što se tiče razvojnih struktura nefrona, više su pozitivne od PCT-a u prve tri faze, a pozitivnije od DCT-a u Ph1.



**Slika 11.** RAW rezultati AIFM3 u nefronskim strukturama kore fetalnih i postnatalnih humanih bubrega. Potpuno diferencirani glomeruli (G), proksimalni zavijeni tubuli (PCT), distalni zavijeni tubuli (DCT), nezreli glomeruli (IG), tijela u obliku slova S (SSB), tijela u obliku zareza (CSB) i bubrežni mjehurići (RV), prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, 1, 5 godina (Ph4 1,5 Y). Dovoljno razvojnih struktura (IG, SSB, CSB i RV) pronađeno je u prve tri faze. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (a) Usporedba istih struktura iz različitih razdoblja. (b) Usporedba zrelih i nezrelih glomerula iz istog razdoblja. (c) Usporedba DCT, PCT, SSB, CSB i RV iz istog razdoblja.



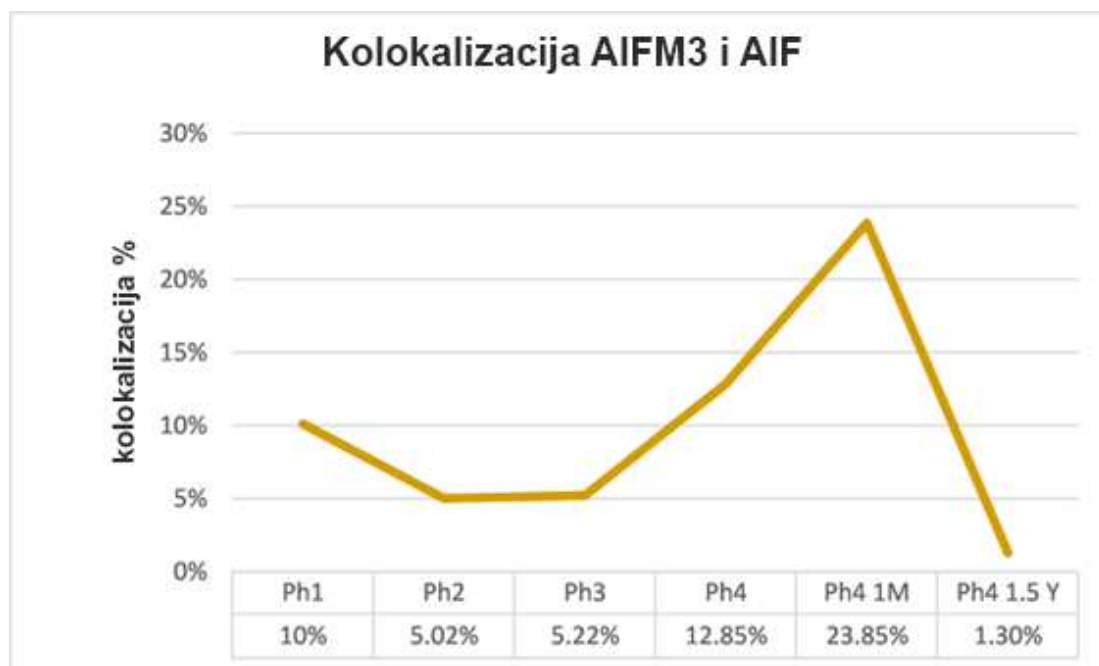
Značajno su veće RAW vrijednosti AIF u DCT-a u prenatalnim i postnatalnim Ph4, nego svim ranijim fazama ( $p < 0,0001$ ) (Slika ). Za razliku od AIFM3, razvojne strukture nefrona nemaju pozitivan signal AIF (Slika 13).



**Slika 13.** Usporedba RAW vrijednosti AIF-a u istih struktura u kori u različitim razvojnim fazama humanih bubrega. Potpuno diferencirani glomeruli (G), proksimalni zavijeni tubuli (PCT), distalni zavijeni tubuli (DCT), nezreli glomeruli (IG), tijela u obliku slova S (SSB), tijela u obliku zarez (CSB) i bubrežni mjehurići (RV), prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, godinu i pol nakon rođenja (Ph4 1,5 Y). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### c) Kolokalizacijska analiza AIFM3 i AIF

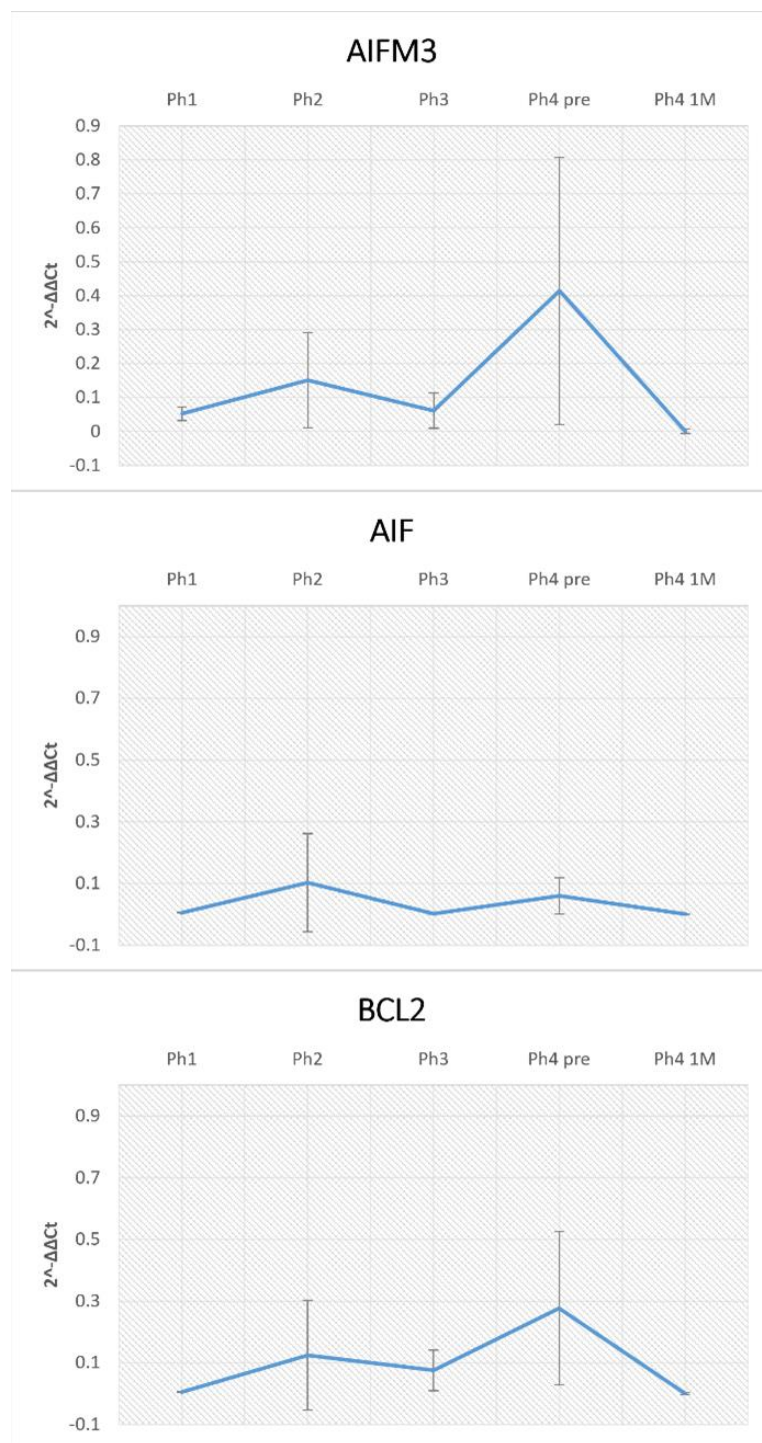
Uporabom dvostruke imunofluorescencije analizirana je kolokalizacija AIFM3 i AIF u različitim fazama razvoja bubrega, a bila je od 23,85% u Ph4 1 M do 1,3% u Ph4 1,5 Y (Slika 14).



**Slika 14.** Vrijednosti ko-lokalizacije prikazane kao postoci u obliku grafikona i tablice. Prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, 1,5 godina nakon rođenja (Ph4 1,5 Y)

### d) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoda

RT-qPCR analiza otkrila je najveći izražaj mRNA *AIFM3* u Ph4 1M, što odgovara rezultatima imunofluorescencije. S druge strane, isti rezultati ukazuju na najniži izražaj u prenatalnoj Ph4 (Slika 15; a). Analiza *AIF* je pokazala sličan trend izražaja kao u PPPPS (Slika 15; b). Dobiveni podaci su korišteni za izvođenje dvosmjernog ANOVA testa s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi koji nije otkrio značajne razlike u mRNA *AIFM3* i *AIF* u pojedinim razvojnim fazama. *BCL2* mRNA analiziran u svim testiranim tkivima nije pokazao značajnih razlika između razvojnih faza. Dvosmjerni ANOVA test s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi nije otkrio značajne razlike između *AIFM3*, *AIF* i *BCL2*.



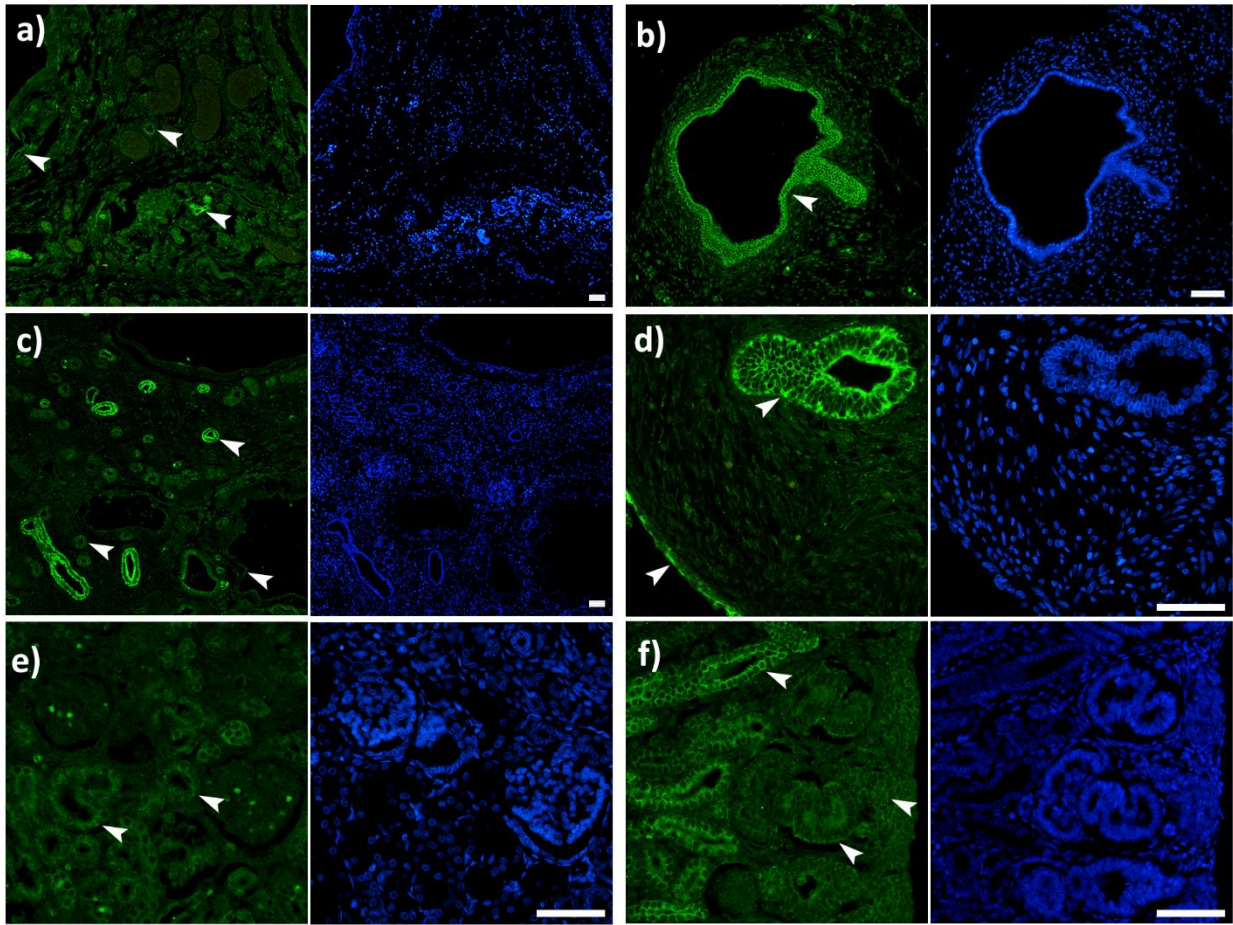
**Slika 15.** RT-qPCR analiza fetalnih i postnatalnih humanih bubrega provedena uporabom početnica za *AIFM3*, *AIF* i *BCL2* i njihove pripadajuće aritmetičke sredine  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednosti sa SD.

#### 4.1.2. Kvalitativna analiza AIFM3 u ispitanika s CAKUT-om

Kvalitativna analiza AIFM3 provedena je na histološkim preparatima bubrega i/ili mokraćovoda perinatalno ili neonatalno umrle djece s CAKUT fenotipovima tipičnim za sindrom delecije 22q11 (hipoplazija bubrega, displazija, ciste, dvostruki sustav prikupljanja, potkovasti bubreg) (54,56,138), imunofluorescentnom metodom i uspoređena s razvojnim bubrezima kao kontrolom.

Primitivni tubuli obloženi kubičnim do cilindričnim epitelom i manje ciste nastale proširenjem tubula u kori i meduli policističnih displastičnih i displastičnih bubrega pokazali su homogeno bojanje vrlo jakog intenziteta (Slika a, b, c, d). Velike ciste obložene spljoštenim epitelom su bile slabije pozitivne (Slika ; c, d). Manji, slabije formirani glomeruli su imali slab intenzitet ili su bili negativni, a umnoženi rahli mezenhim bio je pozitivniji nego MM u kontroli iste razvojne faze (Slika 16; b). Nefroni potkovastih bubrega imaju zrnati obrazac bojanja sa slabijim intenzitetom signala od nefrona u kori normalnih bubrega iste gestacijske dobi (Slika 16; e). U policističnom potkovastom bubregu je signal bio slabiji nego u cističnom bubregu bez potvrđene trisomije 18. Tubuli su imali blagi signal u svim uzorcima trisomije 18, a u kontrolnim uzorcima koji pripadaju istoj fazi razvoja signal je bio jak.

U slučaju jednostrane ageneze bubrega, AIFM3 je ispitan u drugom bubregu (Slika 16; f). Intenzitet i obrazac izražaja nisu se razlikovali od kontrolnih uzoraka u istoj razvojnoj fazi. U zdravim i patološki promijenjenim mokraćovodima, AIFM3 nije bio izražen. Slučajevi u kojima su bubrezi bili hipoplastični, normalni i s patološki promijenjenim mokraćovodima ili uredni, ali s kontralateralnim bubregom koji ima CAKUT fenotip, imali su normalni obrazac izražaja *AIFM3* za dob.



**Slika 16.** Imunofluorescentno bojanje humanog bubrega sa CAKUT fenotipovima perinatalno i neonatalno umrle djece s AIFM3 (zeleno) i DAPI neklearnim bojanjem (plavo). Izražaj proteina AIFM3 (strelice). Mjerilo 40  $\mu$ m.

(a) Displastični fetalni bubreg s brojnim jako pozitivnim primitivnim tubulima obloženim kubičnim epitelom.

(b) Manja cista nastale proširenjem tubula u displastičnom bubregu pokazuje homogeni jaki intenzitet bojenja, a okružena je slabije pozitivnim rahlim mezenhimom.

(c) Policistična displazija bubrega Potter tip IIA s brojnim primitivnim tubulima obloženim kubičnim do cilindričnim epitelom i manjim cistama nastalim proširenjem tubula s homogenim bojanjem jakog intenziteta. Velike ciste obložene spljoštenim epitelom su slabije pozitivne.

(d) Hiperproliferirani primitivni tubul jako pozitivne citoplazme u blizini velike ciste (dolje lijevo) obložene spljoštenim epitelom slabijeg intenziteta bojanja.

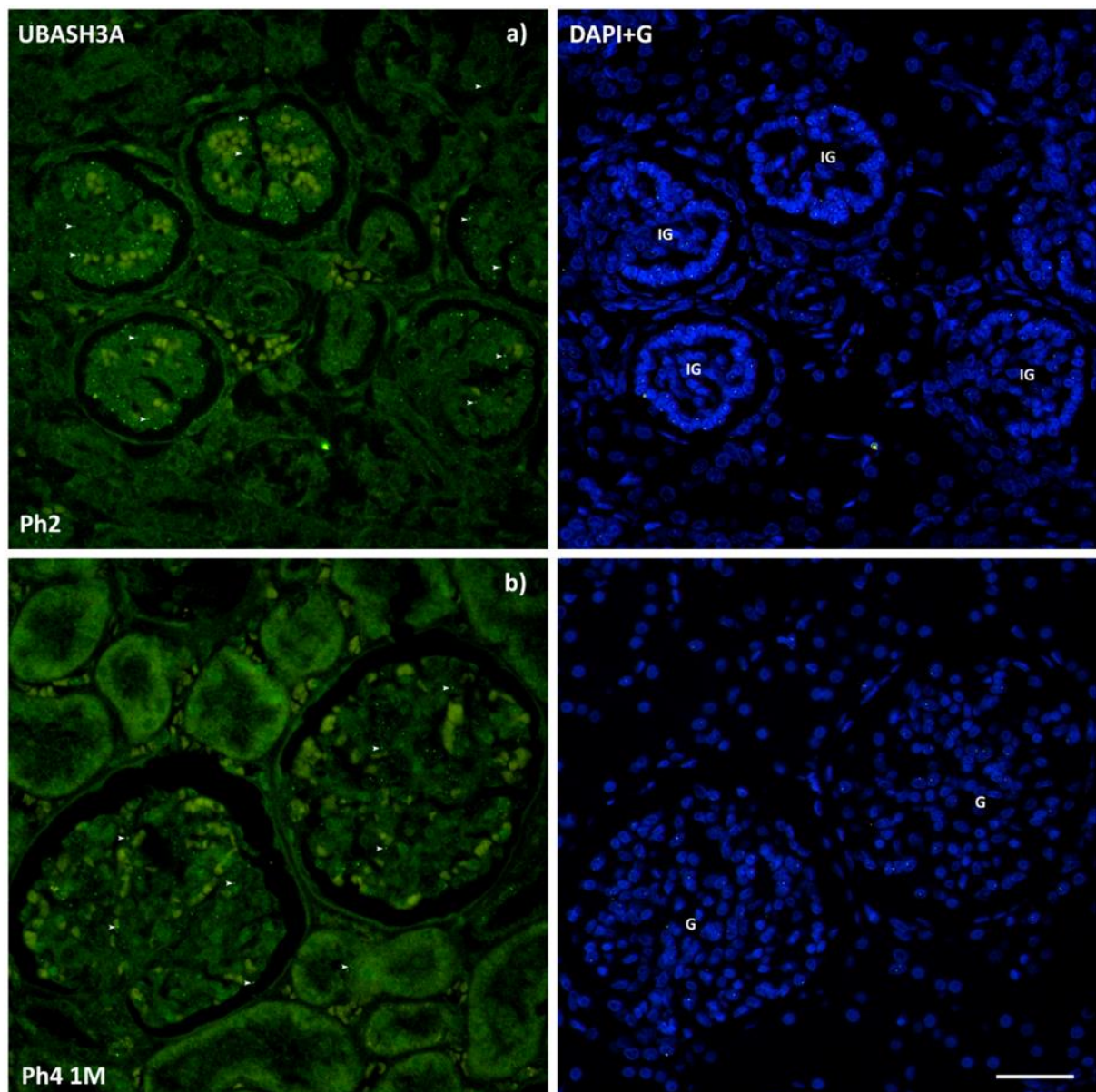
(e) Potkovasti bubreg (trisomija 18) s tubulima koji pokazuju zrnato blago obojenje.

(f) Kod jednostrane ageneze bubrega, drugi bubreg pokazuje obrazac izražaja primjeren za dob.

## 4.2. *UBASH3A*

### 4.2.1. Kvantitativna analiza izražaja *UBASH3A* po razvojnim fazama bubrega

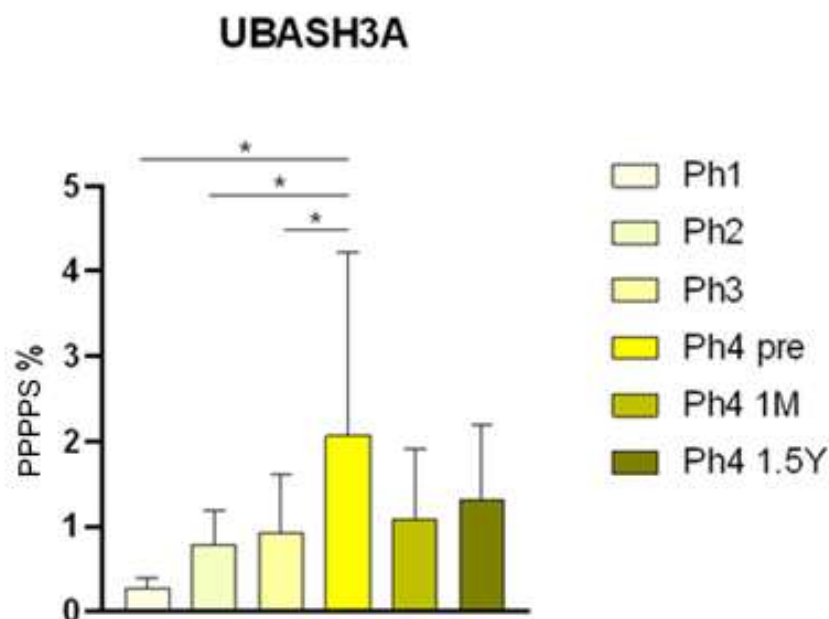
Kvantitativna analiza razine *UBASH3A* proteina je urađena imunofluorescentnom metodom na preparatima bubrega u 13., 16., 21., 27., 29., 37. i 38. tjednu razvoja i dva ispitanika starosti 1,5 mj. i 1,5 godinu. Glavne mjere ishoda su bile PPPPS, RAW score i  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . *UBASH3A* je prikazan kao zeleno nuklearno bojanje i utvrđen u svim razvojnim fazama. Intenzitet tubularnog bojanja i bojanja u razvojnim strukturama je bio slab, a u glomerulima umjeren bez obzira na zrelost (Slika 17).



**Slika 17.** Imunofluorescentno bojanje fetalnih (a) i postnatalnih (b) humanih bubrega s UBASH3A (zeleno) i prikaz izoliranog zelenog signala s DAPI nuklearnim bojanjem. Izražaj proteina UBASH3A (strelice), glomeruli (G) i nezreli glomeruli (IG). Pronađene su značajne razlike u imunoreaktivnosti između potpuno diferenciranih (b) i nezrelih (a) glomerula. Slike (a, b) povećanje 40×. Mjerilo 40 μm.

### a) PPPPS

Što se tiče postotka površine, u prenatalnoj Ph4 je bio značajno veći nego u prve tri faze ( $p < 0,05$ ). Najmanja srednja vrijednost je bila 0,28% u Ph1, a najveća 2,07% u prenatalnoj Ph4 (Slika 18).

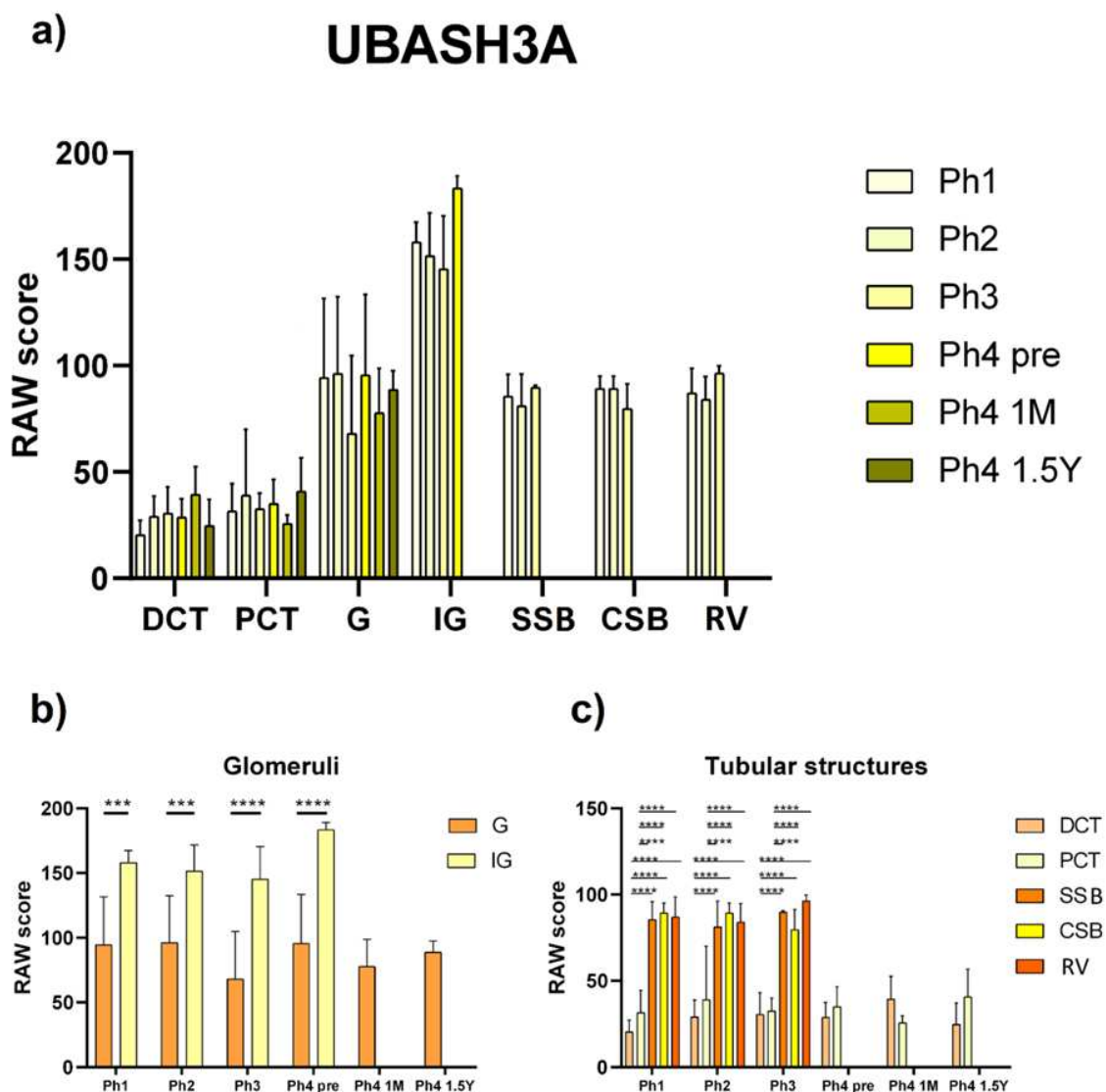


**Slika 18.** PPPPS UBASH3A u fetalnoj i postnatalnoj kori humanog bubrega.

Prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, 1, 5 godina nakon rođenja (Ph4 1,5 Y). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani jednosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*  $p < 0,05$ .

### b) RAW score

Statističkom analizom RAW vrijednosti istih struktura u različitim fazama nije nađena značajna razlika. Sidakov test višestruke usporedbe je otkrio različitu imunoreaktivnost između potpuno diferenciranih i nezrelih glomerula ( $p < 0,001$  u Ph1 i Ph2,  $p < 0,0001$  u Ph3 i Ph4 pre) ako su strukture bile prisutne za provođenje usporedbe. Razvojne strukture izvedene iz MM (SSB, CSB i RV) su bile značajno pozitivnije od zrelih tubula (DCT i PCT) ( $p < 0,0001$ ) (Slika 19).

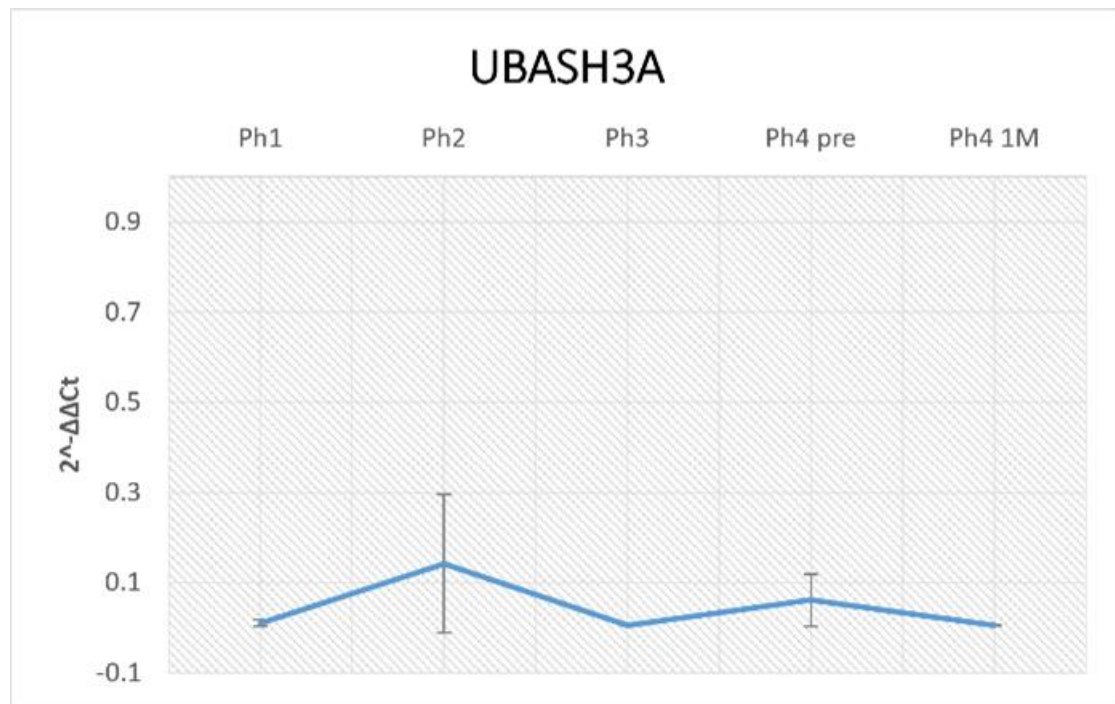


**Slika 19.** RAW rezultati UBASH3A u nefronu fetalnih i postnatalnih humanih bubrega. Potpuno diferencirani glomeruli (G), proksimalni zavijeni tubuli (PCT), distalni zavijeni tubuli (DCT), nezreli glomeruli (IG), tijela u obliku slova S (SSB), tijela u obliku zareza (CSB) i bubrežni mjehurići (RV), prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre), neonatalna faza četiri (Ph4 1 M) i faza četiri, godinu i pol nakon rođenja (Ph4 1,5 Y). Dovoljno razvojnih struktura (IG, SSB, CSB i RV), za statističke analize, bilo je u prve tri faze. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani dvosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (a) Usporedba istih struktura iz različitih razvojnih faza. (b) Usporedba zrelih i nezrelih glomerula iz iste razvojne faze. (c) Usporedba DCT, PCT, SSB, CSB i RV iz iste razvojne faze.



### c) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoda

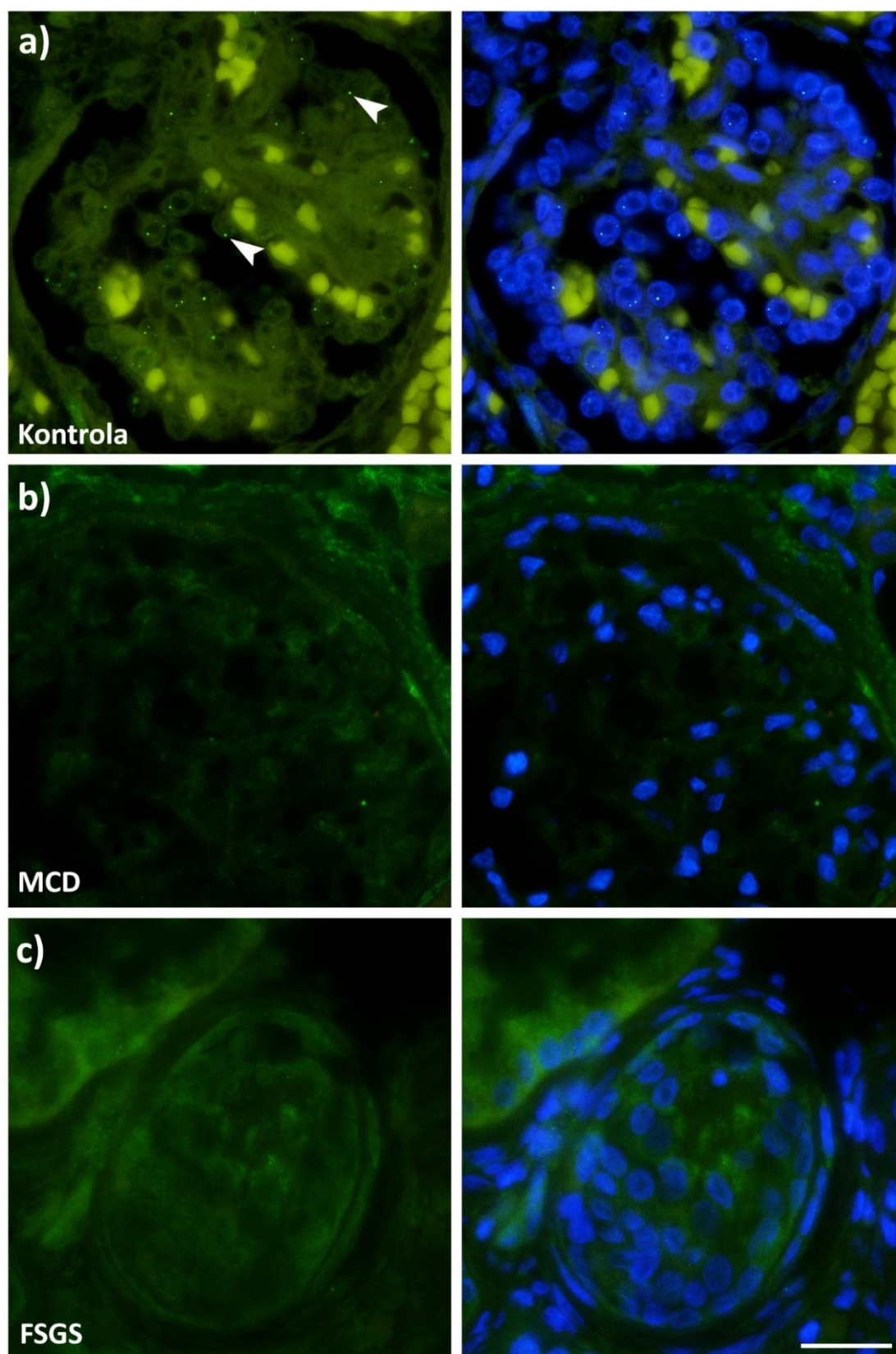
RT-qPCR analiza nije pokazala značajnu razliku u izražaju mRNA *UBASH3A* između različitih razvojnih faza humanog bubrega.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrijednosti ukazuju na najniži izražaj mRNA u Ph2, ali s velikom standardnom devijacijom (Slika 20).



**Slika 20.** RT-qPCR analiza fetalnih i postnatalnih humanih bubrega provedena korištenjem početnica za *UBASH3A* i njihove aritmetičke sredine  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrijednosti sa SD.

### 4.2.2. Kvalitativna analiza FSGS i MCD

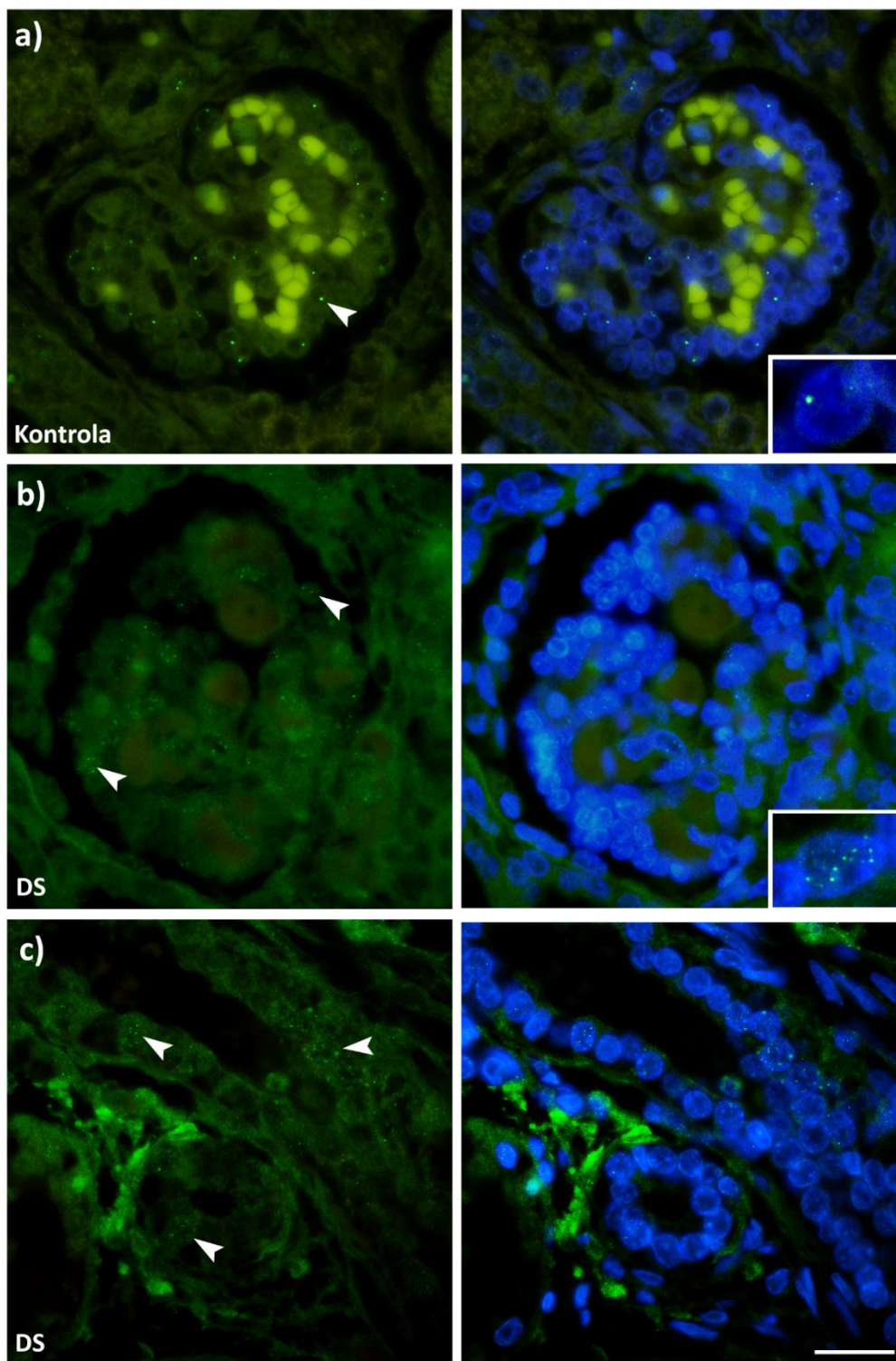
Preparati perkutanih biopsija bubrega 5 ispitanika s FSGS i 5 ispitanika s MCD su obojeni imunofluorescentom metodom i uspoređeni s kontrolom. Za razliku od kontrola, nije nađen pozitivan točkasti zeleni signal u glomerulima i tubulima (Slika 21).



**Slika 21.** Prikaz imunofluorescencijskog bojanja anti-UBASH3A protutijelom na uzorku kontrolnog zdravog bubrega (a), uzorku MCD (b) i uzorku FSGS (c). Kontrolni uzorak ima intenzivni točkasti obrazac izražaja UBASH3A proteina na velikom povećanju 100x, kojeg nema u MCD-u i FSGS-u. Mjerilo je 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.3. Kvalitativna analiza Down sindroma s CAKUT fenotipom

Za imunofluorescencijsko istraživanje *UBASH3A* u trisomiji 21, analizirano je tkivo dva malformirana bubrega prijevremeno rođenog djeteta (33. tjedan gestacije) s dijagnosticiranim DS. CAKUT fenotip je bila bilateralna multicistična displazija s bilateralnim megaureterom. *UBASH3A* je pokazao pozitivni obrazac izražaja u glomerulima, parijetalnom epitelu i tubulima, različite u intenzitetu, raspodjeli i količini u odnosu na kontrolni razvojni bubreg. U uzorcima DS, signal je bio jasan tek na povećanju 1000x, a u kontroli 400x, što upućuje na smanjeni intenzitet izražaja. U jezgrama u DS je signal bio zrnat i raspršen, a u kontroli jedinstven (Slika 22).



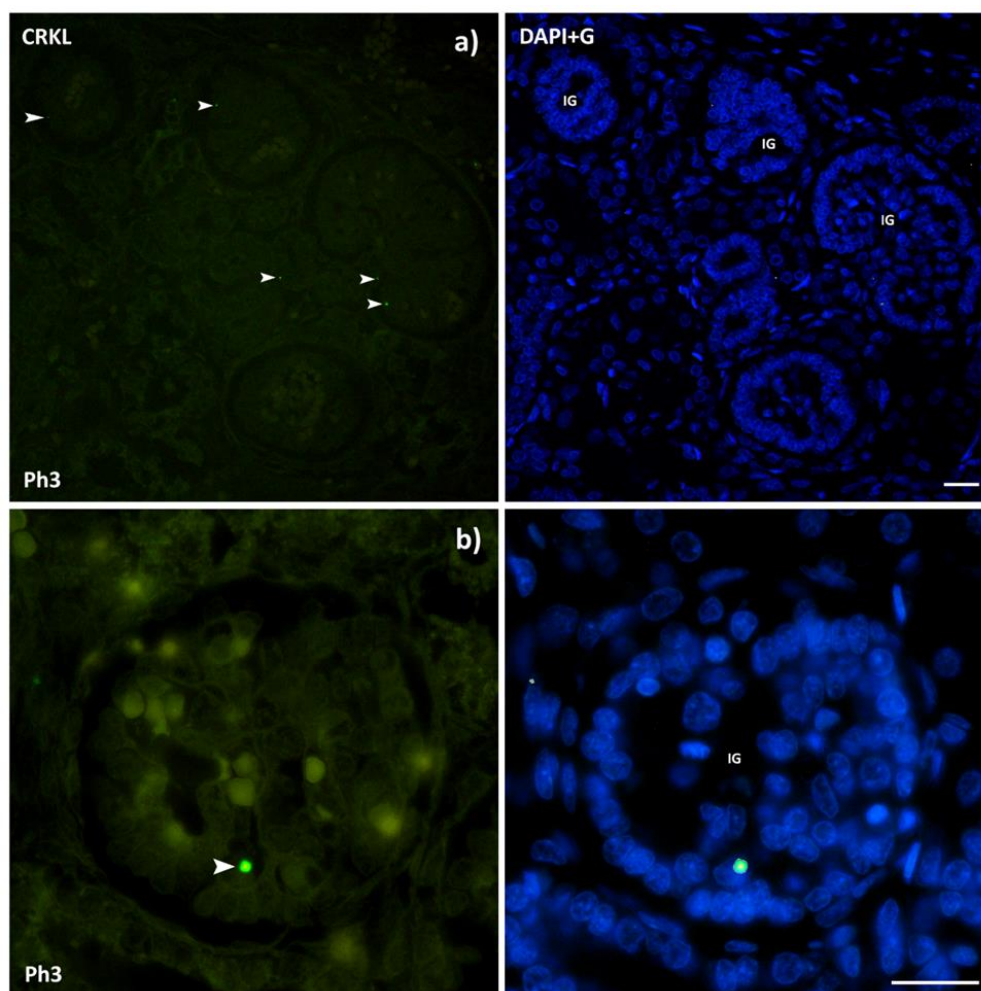
**Slika 22.** Imunofluorescentno bojenje s anti-UBASH3A u kontroli (29w, a) i DS (33w, b i c). Kontrolni uzorak ima intenzivni točkasti obrazac izražaja u jezgrama stanica glomerula na povećanju 100x, a DS zrnati raspršeni slabiji signal. Mjerilo je 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. *CRKL*

#### 4.3.1. Kvantitativna analiza izražaja *CRKL* po razvojnim fazama bubrega

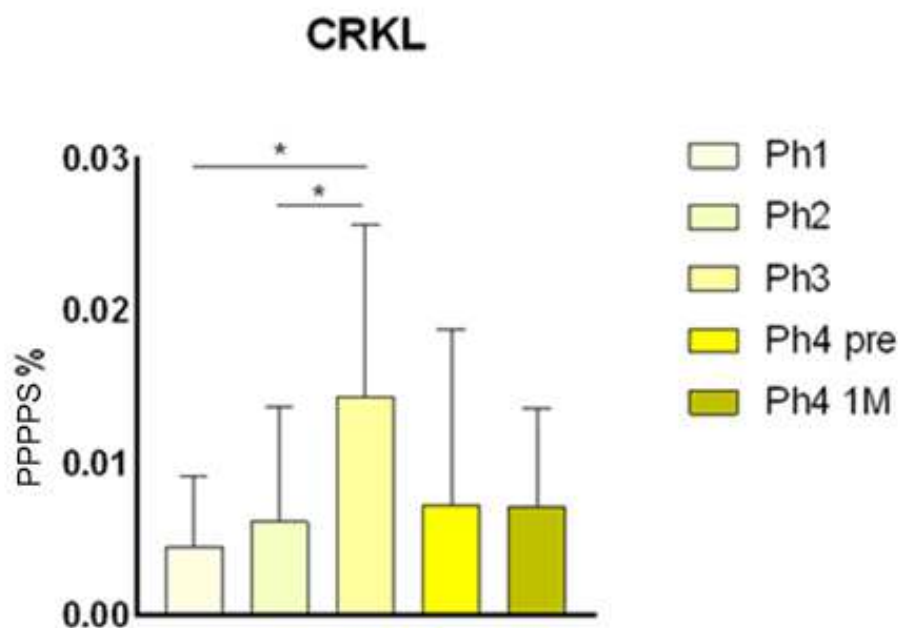
##### a) PPPPS

Stanice pozitivne na *CRKL* imale su jako točkasto bojanje i nađene su u svim fazama razvoja. Pozitivne stanice su bile rijetke u glomerulima, parijetalnom epitelu, DCT-ima, PCT-ima, krvnim žilama, mezenhimu i svim razvojnim strukturama, s lokalizacijom signala u jezgri (kolokalizacija s DAPI) ili rjeđe u citoplazmi (Slika 23).



**Slika 23.** Imunofluorescentno bojanje fetalnih bubrega s *CRKL* (zeleno) i prikaz izoliranog zelenog signala s DAPI nuklearnim bojanjem. Izražaj *CRKL* proteina (strelice), nezreli glomeruli (IG). Pozitivne stanice imaju jako točkasto nuklearno bojanje. Slika (a) je snimljena uz povećanje od 40 $\times$ , dok je (b) snimljena na 100 $\times$ . Mjerilo je 20  $\mu$ m.

Nije bilo dovoljno pozitivnih struktura za brojanje stanica, ali je postotak pozitivne površine izračunat za sve faze. Analiza je pokazala statistički značajne razlike između Ph1 i Ph3 ( $p < 0,05$ ), te Ph2 i Ph3 ( $p < 0,05$ ) (Slika 24).

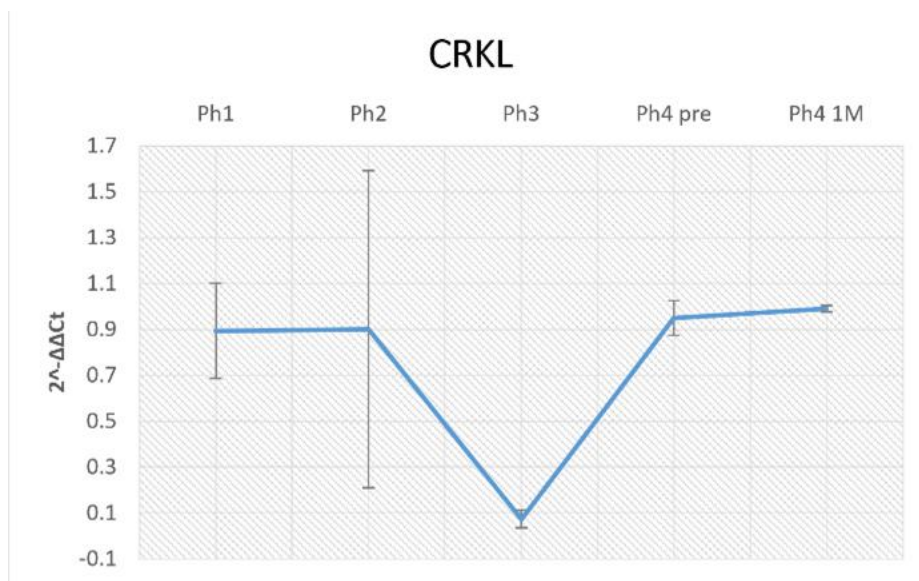


**Slika 24.** PPPPS CRKL u kori fetalnog i postnatalnog bubrega.

Prva faza (Ph1), druga faza (Ph2), treća faza (Ph3), prenatalna faza četiri (Ph4 pre) i neonatalna faza četiri (Ph4 1 M). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD (vertikalna crta) i analizirani jednosmjernim ANOVA testom s Tukeyjevim testom višestrukih usporedbi. Značajne razlike su označene s \*  $p < 0,05$ .

## b) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoda

Izražaj *CRKL* mRNA je ubikvitaran u humanom tkivu bubrega i bez značajnih razlika u razvojnim fazama, što se RT-qPCR metodom potvrdilo. Ph3 je faza najaktivnije transkripcije *CRKL* (Slika 25).



**Slika 25.** RT-qPCR analiza fetalnih i postnatalnih humanih bubrega provedena korištenjem početnica za *CRKL* i pripadajuće aritmetičke sredine  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrijednosti sa SD.

#### 4.3.2. Kvalitativna analiza CAKUT uzoraka

Kvalitativna analiza CRKL je urađena imunofluorescentnom metodom na preparatima bubrega i/ili mokraćovoda fetusa i novorođedečadi s CAKUT fenotipom i nalazi uspoređeni s kontrolom. Obrazac izražaja CRKL proteina se nije razlikovao između zdravih organa i organa zahvaćenih CAKUT-om. U morfološki nepromijenjenim bubrezima (kontralateralni bubreg u agenezi jednog bubrega, hipoplazija bubrega) nađen je pozitivan nuklearni signal u stanicama glomerula, parijetalnom epitelu, DCT-ima, PCT-ima, krvnim žilama, mezenhimu i razvojnim strukturama, jednako kao u kontrolnim bubrezima. U displastičnim bubrezima nađen je točkasti signal u nepravilnim nezrelim glomerulima i u tubulima. U slučaju dvostrukih mokraćovoda, nije uočen pozitivan signal kao ni u kontroli.

## **5. RASPRAVA**



U ovoj studiji su po prvi put karakterizirani prostorno-vremenski obrasci izražaja tri CAKUT kandidat gena *CRKL*, *UBASH3A* i *AIFM3* tijekom četiri faze normalnog razvoja humanog bubrega i postnatalno. Po prvi put je opisan prostorni izražaj *AIFM3* i *CRKL* gena u bubrezima i mokraćovodima perinatalno i neonatalno umrle djece s CAKUT-om, te izražaj *UBASH3A* gena u ispitanika s DS i ispitanika s podocitopatijama. Studija je utemeljena na hipotezi da *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A* geni imaju ulogu u razvoju bubrega na način da se izražaj njihovih proteinskih produkata prostorno-vremenski dinamično mijenja i taj obrazac razlikuje od CAKUT-a. Izbor analiziranih gena temeljio se na *in silico* analizi baze podataka dobivene sekvenciranjem cijelog genoma bolesnika s potvrđenim CAKUT-om, koja je bila provedena u Irving Medicinskom centru Sveučilišta Columbia u New Yorku, SAD i među ostalima, istaknula navedene gene kao kandidat gene za CAKUT.

### 5.1. *AIFM3*

U našoj studiji je prvi put kvantificirana aktivnost *AIFM3* u razvoju bubrega mjerenjem razine mRNA *AIFM3* i uspoređene s razinom AIFM3. Prema imunofluorescentnom nalazu, AIFM3 je bio pretežno lociran u epitelu tubula, a manje u glomerulima. Rezultati su u skladu s nekoliko velikih *AIFM3* istraživanja u različitim humanim tkivima uključujući bubreg (24,49). Uočili smo značajne razlike u prostorno-vremenskom izražaju *AIFM3* s maksimalnom vrijednosti u neonatalnom razdoblju, fazi Ph4 1M. Prema PPPPS-a je bio veći izražaj *AIFM3* u prenatalnoj Ph4 i postnatalnoj Ph4 1M nego u prve tri razvojne faze. Veći je izražaj u Ph4 1M nego u Ph4. Prema RT-qPCR je najviša transkripcijska aktivnost bila u Ph4, što se poklapa s rezultatima imunofluorescencije. S druge strane, srednja vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  prenatalne Ph4 je najniža vrijednost mRNA, ali zbog velike SD rezultat nije pouzdan. Analiziran je fetalni bubreg u cijelosti, a ne samo bubrežna kora. U srži su jako imunoreaktivne stanice sabirnih kanala i nešto manje stanice Henleove petlje. Maleni uzorci fetalnih bubrega u ranim fazama sadržavali su cijelu srž, a u kasnijim fazama različit omjer kore i srži s prevladavanjem kore.

S obzirom da je *AIFM3* na kromosomu 22, a CAKUT fenotipovi u 22.11q delecijском sindromu su velike malformacije, primjerice hipoplazija bubrega, displazija, ciste, dvostruki mokraćovod i potkovasti bubreg, očekivali smo veće razine AIFM3 u ranijim razvojnim fazama normalnog bubrega, posebno u Ph1 (14,56,81,138).

Naši rezultati su pokazali općenito oskudni izražaj *AIFM3* u glomerulima, ali veću pokrivenost površine u Ph4 što je povezano sa sazrijevanjem organa. AIFM3 ima ulogu u

energetskom metabolizmu i povećanim energetskim potrebama u glomerulu tijekom njegova naglog rasta. Iako bubrezi novorođenčadi imaju konačni broj nefrona pri rođenju, njihovo morfološko i funkcionalno sazrijevanje odvija se tijekom prvih mjeseci i godina života (139,140). U Ph4 četverostruko se poveća GFR zbog povećanja površine glomerula. To je praćeno povećanjem reapsorpcije elektrolita i vode u tubulima zbog očuvanja glomerulotubularne ravnoteže (140).

Općenito se lokalizacija *AIFM3* u lumenu tubula pripisuje aktivnom transportu (141) pa bi povećanje aktivnosti transportera bio razlog povećanog izražaja *AIFM3* u PCT. Rezultati RAW ukazuju na stabilnost izražaja *AIFM3* u DCT u razvojnem bubregu. S druge strane, u PCT je nađen nagli porast citoplazmatskog izražaja u Ph4. To se može pripisati obilju mitohondrija smještenih između bazolateralnih nabora i interdigitacija, a koji su odgovorni za stanično disanje (142). Funkcija bubrega je energetski zahtjevna. PCT stvaraju velike količine ATP-a putem OXPHOS radi aktivne reapsorpcije glukoze i laktata koji bi se inače gubili mokraćom (6). OXPHOS, s pojačanim izražajem *AIFM3*, raste da zadovolji potrebe za ATP-om.

Više eksperimentalnih studija na kunićima pokazale su da u razvoju bubrega veći transport tvari prati veća količina njihovih transportera. Većina ovisnih o natriju, osobito kotransporter natrijevog fosfata, nalaze se na četkastom luminalnom rubu PCT-a, a nakon prestanka nefrogeneze poveća se i bazolateralni membranski transport (143,144). Schmidt i Horster izmjerili su aktivnost Na-K ATPaze u zrelim i nezrelim PCT-ima i ustanovili da se u zrelim tubulima udvostručila (145,146). Ti rezultati sukladni su našim rezultatima iz razvojne faze Ph4 humanog bubrega. Dokazi o važnosti *AIFM3* u proizvodnji energije u glomerulima i PCT tijekom nefrogeneze i sazrijevanja tubula naglašavaju ulogu *AIFM3* gena u mitohondrijskoj bioenergetici (140).

Nasuprot tome, u analizi Ph4 1.5Y, PPPPS naglo opada za *AIFM3* i *AIF*. Ne može se sa sigurnošću zaključivati na temelju jednog analiziranog slučaja i pretpostavljamo da je niskom postotku doprinijelo to što su se glomeruli, koje inače malo izražavaju te biljege, povećali pa zauzimaju relativno veću površinu mikrofotografija.

Po našem znanju, ovo je prvo istraživanje izražaja *AIF* u razvoju humanog bubrega. Analizirali smo prostorno-vremenski izražaj *AIFM3* i *AIF* metodom dvostruke imunofluorescencije i ispitali jesu li usklađeno koeksprimirani u istim stanicama. Uporabom RT-qPCR metode, analizirali smo količinu mRNA transkripata *AIFM3*, *AIF*, te *BCL2*.

U prve tri faze, *AIF* je bio značajno jače izražen u zrelih zavijenim tubulima. *AIF* u mitohondriju potiče sklapanje Komplexa I ETC-a – mjesta u kojem se stvara ROS u fiziološkim i patološkim uvjetima. Mitohondrijski metabolizam je bitan za razvoj ploda, no treba spriječiti nakupljanje nusprodukta ROS-a (147,148). *AIF*-a je redoks aktivni enzim. Miševi kojima je nedostajao *AIF* su imali prekomjernu proizvodnju ROS-a, te je oksidativni stres imao ulogu u nastanku razvojnih bubrežnih bolesti (149). S obzirom na ulogu *AIF*-a u regulaciji OXPHOS-a u drugim tkivima i velike količine ATP-a potrebne za održavanje metaboličke homeostaze u bubrezima, pretpostavili smo da bi *AIF* mogao imati sličnu ulogu u razvoju bubrega.

Prostorno preklapanje izražaja *AIF*-a i *AIFM3* je rijetko, a najveće u Ph4. U toj fazi zbog veće razine *AIFM3* u PCT, naglo poraste kolokalizacija s *AIF*. Općenito je kolokalizacija rijetka, što se može obrazložiti različitim funkcijama tih proteina unatoč homolognim domenama koje im osiguravaju pro-apoptotske i pro-životne osobine. Oba proteina sudjeluju u raznolikim i dijelom nepoznatim staničnim procesima.

Značajna homologija u oksidoreduktaznoj domeni i ubikvitarna lokalizacija *AIFM3* i *AIF*-a u svim organima (24) implicira da *AIFM3* može dijeliti neapoptogenu *housekeeping* ulogu održavanja kompleksa I u fiziološkim uvjetima i ulogu uklanjanja slobodnih radikala radi preživljavanja stanice. Studija na neuronima medaka ribica je dokazala da *AIFM3* sudjeluje u razvoju i održavanju živčanog sustava uklanjanjem ROS-a (149). Pretpostavljamo da se to može primijeniti na razvoj bubrega zbog izražaja *AIFM3* u nefronu. *AIFM3* i nekoliko drugih molekula za uklanjanje slobodnih radikala detoksificira višak ROS-a i tako prevenira oksidativni stres. Skupina gena s globalnim obrascem izražaja najvećim u neonatalnom razdoblju štakora poklapa se s izražajem *AIFM3* Ph4 razvoja humanog bubrega. Ta skupina gena sadrži više gena odgovornih za zaštitu od oksidativnog stresa i metabolizam energije, što smatramo glavnom ulogom *AIFM3* (150).

Prisutnost *AIFM3* u strukturama nefrona u ranom razvoju ukazuje da je uključen u apoptozu posredovanu kaspazom-3, jer inhibicija kaspaze zaustavlja razvoj metanefrosa (151,152). Anti-apoptotički *BCL2* transkript je postojan u svim razvojnim fazama prema analizi RT-qPCR, a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vrijednosti usporedive su s izražajem *AIFM3*. Moguća sekundarna uloga *AIFM3* u razvojnom bubregu je pro-apoptotička aktivnost ovisna o kaspazi. Apoptoza je najčešća na granici vršnog mezenhima i neposredno prije kraja nefrogeneze, na prelasku Ph3 u Ph4. Kad se MM pretvara u nefrone, prvi korak je agregacija u 'kondenzat'. Preteče te

strukture su proliferativne, izražavaju PAX i BCL2 proteine i imaju nisku stopu apoptoze. Obrnuto, stanice na granicama 'kondenzata' imaju visoku stopu apoptoze, vjerojatno kako bi se regulirao broj stanica u svakom nefronu (153). Obrazac izražaja *AIFM3* u MM se u Ph4 ne mijenja, što znači da ne sudjeluje u apoptozi, nego u proliferaciji MM. Izražaj je jači u tubulima nego u MM, a apoptoza u tubulima nije česta (153). Mezenhim displastičnog bubrežnog tkiva se nepravilno umnaža i transdiferencira u glatke mišiće umjesto da stvara nefron (154).

Možemo zaključiti da je primarna uloga AIF i *AIFM3* promicanje preživljavanja stanica. Kako nema pozitivnog izražaja *AIF* u razvojnim strukturama nefrona, samo se *AIFM3* smatra relevantnim za nefrogenezu.

Kongenitalna displazija bubrega je posljedica poremećaja u diferencijaciji progenitora nefrona. U novorođenčadi je najčešći uzrok kronične bubrežne bolesti i zatajenja bubrega (155,156). U displaziji bubrezi nisu normalno diferencirani, što rezultira prisutnošću primitivnih tubula, intersticijske fibroze, bubrežnih cista i hrskavice u bubrežnom parenhimu (154). U našem uzorku, bubrežna displazija je nastala zbog intrinzičnog defekta u diferencijaciji bubrežnog parenhima, a ne funkcionalne ili strukturne opstrukcije donjeg urinarnog sustava. U ispitivanju prostornog izražaja *AIFM3*, analizirani su policistični displastični bubrezi Potter tip IIA. Ako je ta anomalija bilateralna, fatalna je već u novorođenčadi, a ako je unilateralna može biti asimptomatska do odrasle dobi (12).

Za razliku od zrnatog izražaja *AIFM3* u zdravom razvojnom bubregu, u policističnom displastičnom i displastičnom bubregu nalazi se intenzivni homogeni izražaj u epitelu primitivnih tubula i cistično proširenih tubula, u kojima se ujedno odvija pretjerana proliferacija i apoptoza (153). Poznato je da prekomjerni izražaj *AIFM3* inducira apoptozu, što je eksperimentalno dokazano povećanjem citoplazmatskih nukleosoma i subdiploidnih staničnih populacija u stanicama koje su bile transficirane s *AIFM3* (24). Bioinformatičke analize su ukazale da *AIFM3* stupa u interakciju s proteinom CAD (28) koji je neophodan za staničnu proliferaciju (29). Proliferacija je energetski zahtjevna i kako bi se zadovoljile potrebe za ATP-om, povećan je izražaj *AIFM3* i OXPHOS (25). U displaziji bubrega, prekomjernu proliferaciju prati apoptoza tubularnih epitelnih stanica (155), ali se ne može zaključiti koju od tih uloga *AIFM3* igra u patološkom stanju, ili možda igra obje jer mu se funkcija mijenja u odgovoru na okoliš (25).

Nefroni potkovastih bubrega ispitanika s Edwadsovim sindromom imali su slabiji izražaj *AIFM3* nego nefroni u normalnim razvojnim bubrezima iste gestacijske dobi. Tubuli su imali blaži izražaj nego tubuli u normalnim razvojnim bubrezima iste gestacijske dobi. Moguć je utjecaj trisomije ili duplikacije određenih gena na 18 kromosomu, uključenih u nepoznate signalne puteve uzvodno od *AIFM3* koji negativno reguliraju njegovu transkripciju. Do danas nije opisan takav protein. *AIFM3* ima različite fiziološke funkcije, a dostupne informacije otkrivaju širok spektar utjecaja genskih transkripata na ljudsko zdravlje (25). Povećanje ili smanjenje kapaciteta *AIFM3* proteina u različitim scenarijima može uzrokovati različite patološke fenotipove.

## 5.2. *UBASH3A*

Prije našeg, nije bilo istraživanja lokalizacije i dinamike izražaja *UBASH3A* u razvojnom bubregu. Smatralo se da je izražaj *UBASH3A* gotovo specifičan za limfoidne organe, prvenstveno T imfocite (88,114). Feshchenko i suradnici su prvi dokazali nisku razinu transkripta mRNA *UBASH3A* osjetljivom metodom RT-PCR-a, nakon nespecifičnog rezultata na Northern blotingu i obrazložili da je prisustvo *UBASH3A* u nelimfoidnom tkivu moguća posljedica kontaminacije tkiva krvlju (88). U našoj studiji smo kvantificirali mRNA transkript *UBASH3A* i imunofluorescencom potvrdili njegov izražaj u bubrezima. Dokazali smo izražaj *UBASH3A* u stanicama tubula i glomerula svim razvojnim fazama bubrega, manifestiran kao točkasto nuklearno bojanje slabog intenziteta u tubularnom epitelu i umjerenog u glomerulima. Proksimalni kraj SSB-a formira nezreli glomerul koji je još nelobuliran i s barem pola opsega obložen podocitima (157). Na temelju periferne lokalizacije *UBASH3A* u nezrelim glomerulima, zaključujemo da je izražen u podocitima glomerula. *UBASH3A* je izražen u strukturama MM podrijetla jer se sve epitelne strukture nefrona uključujući podocite, izvode iz RV-a (88). Izražaj *UBASH3A* nije se značajno razlikovao između pojedinih razvojnih faza. Analizom postotka površine nađen je veći izražaj *UBASH3A* u prenatalnoj Ph4, kad je rast fetusa maksimalan. RAW rezultati pokazali su značajno veću imunoreaktivnost u strukturama u razvoju od zrelih struktura, što ukazuje na značajnu ulogu u nefrogenezi.

U *in vitro* studiji na staničnoj liniji ccRCC utvrđeno je da *knockdown UBASH3A* inhibira staničnu migraciju i vijabilnost, te inducira metastaziranje (116). To upućuje na povezanost *UBASH3A* i razvoja bubrega, jer je poznato da postoje preklapanja signalnih puteva u razvoju i tumorigenezi.

Regulatorna uloga UBASH3A još nije potpuno poznata. UBASH3A sudjeluje u regulaciji stanične signalizacije Syk-a (protein tirozin kinaze) (114). Syk može igrati ulogu u razvoju bubrega preko GDNF/Ret i PI3K putova, važnih za morfogenezu grananja. Syk se povezuje s Reelin signalnim putem koji uključuje CRKL. UBASH3A je u direktnoj interakciji s Cbl-om kojeg inhibira kako bi potisnuo EGFR signalizaciju (92). SH2 se kao domena CRKL-a specifično veže na Cbl (158). Moguće je da CRKL i UBASH3A dijele zajednički put, što bi moglo objasniti obrasce, odnosno lokalizaciju njihova izražaja. CRK je najznačajnija poveznica između CRKL i UBASH3A. UBASH3A izravno reagira s CRK (98), a CRKL s CRK-om tvori hetero-oligomer (67) što bi ih moglo dovesti u indirektnu interakciju u Reelin signalnom putu u bubregu. UBASH3A bi, kao CRKL, mogao biti nizvodno od DAB1 u Reelin signalnom putu.

Prema literaturi, u podocitopatijama je smanjen izražaj CRK i CRKL, što upućuje na njihovu važnost u patogenezi tih bolesti (62). U našem radu smo, zbog lokalizacije UBASH3A u podocitima razvojnih bubrega i povezanosti s CRK i CRKL, imunofluorescentnom metodom ispitali prostorni izražaj *UBASH3A* u ispitanika s FSGS-om i MCD. Za razliku od razvojnih bubrega, u podocitopatijama je nađen negativni izražaj *UBASH3A*. U većini glomerulopatija abnormalna FB nastaje zbog gubitka nožica, kad su podociti podvrgnuti širenju i povlačenju zbog remodeliranja citoskeleta i međustaničnih spojeva (159). U podocitopatijama, disfunkcija UBASH3A može dovesti do oštećenja FB i proteinurije pa bi bilo korisno ispitati izražaj *UBASH3A* u drugim glomerulopatijama.

U prethodnoj studiji, pokazali smo da je u *Dab1*<sup>-/-</sup> miševa hipoplazija bubrega povezana s gubitkom nožica podocita (87). Maksimalni izražaj *UBASH3A* je u prenatalnoj Ph4 u kojoj je rast zdravog bubrega najveći i povezan s migracijom stanica (116.). Gubitak nožica podocita u FSGS i MCD i moguća ovisnost aktivacije UBASH3A o DAB1 u Reelin signalnom putu; sugerira da je opaženi CAKUT fenotip u *Dab1*<sup>-/-</sup> miševa povezan s neadekvatnom aktivacijom UBASH3A. Navedenu pretpostavku treba dalje istražiti na uzorcima *Dab1*<sup>-/-</sup> miševa.

UBASH3A ima pro-apoptotički učinak koji je posredovan AIF-om (117). U ovoj studiji AIF-a nije dokazan u glomerulima i drugim razvojnim strukturama, nego u PCT i DCT. Općenito je apoptoza rijetka u tubulima (153) pa je odsutnost AIF-a u jezgrama očekivana. U daljnjem istraživanju uradit ćemo dvostruku imunofluorescenciju UBASH3A i AIF.

U ovoj studiji je prvi put ispitan izražaj *UBASH3A* u jednog ispitanika s DS i CAKUT fenotipom. Zbog mapiranja na humanom kromosomu 21 unutar kritične regije za DS, te obrasca izražaja *UBASH3A* u razvojnom bubregu pretpostavili smo da bi prekomjerni izražaj *UBASH3A* mogao biti uključen u nastanak CAKUT fenotipova u DS. Prema literaturi, djeca s Down sindromom imaju značajno manje bubrege u usporedbi s općom populacijom (118,119,121–123). Nerijetko se nalaze nepravilni glomeruli i češće su glomerulopatije. Zna se da je produljenje tubula u Ph4 odgovorno za rast bubreg i da je nedovoljan rast tubula odgovoran za nedovoljno povećanje bubrega nakon dovršetka nefrogeneze (6). Analizom PPPPS-a smo utvrdili maksimalni izražaj *UBASH3A* u displastičnom bubregu ispitanika s SD. *UBASH3A* je bio izražen u glomerulima i tubulima, ali različito od kontrole po intenzitetu, raspodjeli i količini. U jezgrama je izražaj bio slab, zrnat i raspršen, za razliku od kontrole u kojoj je bio jedan jasan točkasti signal. Nije jasno je li složeni CAKUT fenotip u ispitanika s DS nastao zbog neravnoteže normalne doze gena ili je rezultat razvojne nestabilnosti uzrokovane velikim brojem abnormalnih produkata razvojnih gena (126). *UBASH3A* je važan za normalnu nefrogenezu, normalan rast bubrega i morfogenezu podocita. Moguće je da veliki broj abnormalnih produkata *UBASH3A* gena i/ili apoptotski procesi, jer *UBASH3A* pojačava apoptozu ovisnu o AIF, djeluju na stanične funkcije, razvoj CAKUT-a i glomerulopatije u DS.

### **5.3. *CRKL***

U ovom je radu po prvi put kvantificiran transkript *CRKL* gena u razvojnim fazama humanog bubrega od 13. tjedna do postnatalnoga ispitanika od 1,5 godine. Funkcionalna specifičnost ubikvitarnog *CRKL* određena je prvenstveno povezivanjem s jedinstvenim uzvodnim receptorima i proteinskim kompleksima koji su funkcionalno, vremenski i anatomski ograničeni u stanici i tkivu (67). Ispitivanje *CRKL* u različitim tipovima tkiva i stanica trebalo bi otkriti funkcionalne specifičnosti ovisne o signalizaciji.

*CRKL* gen je važan za normalno sazrijevanje bubrega u ljudi, kao i CAKUT fenotipova u DiGeorge sindromu nastalih zbog smanjene diferencijacije i migracije stanica u razvojnom bubregu (49,160). Do sad je izražaj *CRKL* dokazan na različitim mjestima u bubrezima i ostatku urinarnog trakta u ljudi, zebrica i miševa (49). *CRKL* ima citosolnu i nuklearnu funkciju. Može formirati određeni kompleks i translocirati se u jezgru, gdje se veže na tirozinfosforilirani STAT5 i djeluje kao transkripcijski čimbenik (65).

Lopez-Rivera i suradnici su opisali blagi difuzni izražaj u citoplazmi stanica UB i derivata MM u 6. tjednu razvoja. U 21. tjednu, CRKL je prisutan apikalno u epitelu PCT i sabirnim kanalićima. U uzorku bubrega ispitanika starosti 1,5 godina nađen je jaki izražaj *CRKL* na apikalnoj strani epitela u PTC, DCT, sabirnim kanalima, te difuzni izražaj u citoplazmi endotela glomerularnih kapilara, podocita i parijetalnog epitela (49). S druge strane, u Human Protein Atlasu su prikazani rijetki slabi točkasti signali u citoplazmi i membrani epitela tubula i glomerula u humanim bubrezima ispitanika od 7 godina, 28 godina i 56 godina (82).

Kao Lopez-Rivera i suradnici, nismo pronašli iste obrasce izražaja *CRKL* u bubregu u 21. razvojnom tjednu i ispitanika s 1,5 godina. Jaki točkasti izražaj nađen je u svim analiziranim strukturama. Nuklearni, a rijede citoplazmatski točkasti pozitivitet je nađen u glomerulima, parijetalnom epitelu, DCT-ima, PCT-ima, krvnim žilama, mezenhimu i svim razvojnim strukturama. Taj obrazac nalikuje onome iz Human Protein Atlasa i koristili smo protutijela istog proizvođača Sigma-Aldrich, i pretpostavljamo da nuklearna lokalizacija *CRKL*-a može prijeći u citoplazmatsku/membransku. *CRKL* ima relevantnu ulogu transkripcijskog čimbenika tijekom razvoja bubrega, ali ta uloga u djetinjstvu prestaje. Nekoliko studija je ukazalo na uključenost *CRKL* u morfogenezu podocita, a naš nalaz pozitivnog izražaja *CRKL* u podocitima u razvojnim fazama to potvrđuje (62).

Izražaj *CRKL*-a u ovom je radu prvi put istražen dvjema metodama u četiri faze razvoja bubrega. Nađene su rijetke imunoreaktivne stanice s intenzivnim izražajem *CRKL*-a u bubrezima u razvoju, te statistički značajno povećanje PPPPS-a u Ph3 kad se formira 60% nefrona (7,8,10,12). Rezultat je potvrđen RT-qPCR-om, ali među fazama nije bilo statistički značajne razlike. mRNA *CRKL* i *CRKL* su dokazani u svim fazama razvoja bubrega, što implicira njegovu ulogu u održavanju homeostaze i sazrijevanju bubrežnih struktura. U istraživanju promjena u globalnim obrascima izražaja gena tijekom razvoja i sazrijevanja štakorskih bubrega, geni koji kontroliraju prostorno-vremensku raspodjelu maksimalno su izraženi sredinom embriogeneze što se preklapa s humanom Ph3 (150). To je u skladu s ulogom *CRKL*-a u migraciji bubrežnih stanica (57,62,85,160) i činjenicom da nefrogeneza kulminira u Ph3, u kojoj je u našim rezultatima PPPPS bio najveći. Može se zaključiti da *CRKL* ima bitnu funkciju u pozicioniranju stanica u razvoju bubrega.

U mišjem modelu, genetska inaktivacija *Crkl*-a rezultira kongenitalnim anomalijama bubrega i mokraćnog sustava koje nalikuju CAKUT-u kod ljudi (49). U preparatima bubrega



i/ili mokraćovoda perinatalno/neonatalno umrlih s CAKUT fenotipovima nalik na tipične u *Crkl*<sup>-/-</sup> miševa (ageneza bubrega, duplicirani mokraćovodi, displastične značajke, hipoplazija i hipodisplazija bubrega), urađeno je imunofluorescento bojenje i rezultati uspoređeni s zdravom kontrolom. CRKL ima isti točkasti obrazac izražaja u zdravoj kontroli i CAKUT-u. U displastičnom bubregu, točkasti signal nađen je u abnormalnim nezrelim glomerulima i tubulima. Iako nije bila utvrđena genetska pozadina, može se zaključiti da *CRKL* normalno obavlja svoju ulogu u razvoju bubrega ispitanika s CAKUT-om.

Bez obzira na detaljno razumijevanje interakcija koje se javljaju između CRKL-a i njegovih supstrata, nedostaje podatak kako su integrirani u stvarnom vremenu i prostoru u razvoju i patogenezi bubrega.

Zaključno, spoznaje o genetici CAKUT-a u ljudi stalno napreduju. U istraživanju na miševima identificirano je više gena koji reguliraju razvoj bubrega, ali neki geni u miša nisu prisutni u ljudi ili imaju različite paraloge (14). Iako je naša studija na malom broju humanih uzoraka bubrega u 4 faze razvoja, može doprinijeti razjašnjavanju normalnog obrasca CAKUT kandidat gena. U ranom razvoju bubrega su jako izraženi genski produkti uključeni u translaciju proteina i replikaciju DNA (161). Proteini istraživanih kandidat gena su bili značajno manje izraženi u Ph1 nego u kasnijim fazama. Pozitivni izražaj u različitim strukturama humanog bubrega u razvoju i dinamika tog izražaja ukazuju da *CRKL*, *UBASH3A* i *AIFM3* geni igraju važnu ulogu. Genetska heterogenost CAKUT-a odražava uključenost različitih signalnih putova pa je u daljnjem radu potrebno analizirati potencijalne signalne putove u kojima sudjeluju ispitivani kandidat geni kako bi procijenili njihovu regulatornu funkciju tijekom razvoja bubrega. Bolje razumijevanje genetskih osnova bubrežnih anomalija dovest će do preciznije dijagnoze i personaliziranog liječenja u budućnosti.

## **6. ZAKLJUČAK**

1. Pozitivan izražaj *CRKL*, *AIFM3* i *UBASH3A* gena je dokazan imunofluorescentnom metodom u svim razvojnim fazama bubrega, a intenzitet i lokalizacija variraju. *AIFM3* i *UBASH3A* su maksimalno izraženi tijekom intenzivnog prenatalnog i posnatalnog rasta (Ph4 i Ph4 1M), a *CRKL* u Ph3 kad je najveća nefrogeneza. Izražaj *AIFM3* je pretežno u tubulima, a manje u glomerulima. Izražaj *UBASH3A* je u stanicama tubula i razvojnim strukturama nefrona, najviše podocitima. *CRKL* pozitivne stanice su rijetke, ali imaju jako intenzivan izražaj.
2. Općenito je kolokalizacija *AIFM3* i *AIF* rijetka, a najčešće (23,85%) utvrđena u Ph4 1M.
3. mRNA *CRKL*, *AIFM3*, *UBASH3A*, *AIF* i *BCL2* kvantificirana je s RT-qPCR metodom u svim razvojnim fazama bubrega, ali bez statistički značajnih razlika među njima.
4. Analiza izražaja *AIFM3* i *CRKL*, u uzorcima bubrega i mokraćovoda ispitanika s CAKUT fenotipom pokazuje povećani izražaj *AIFM3* u epitelu s velikom proliferacijom i apoptozom. Isti točkasti obrazac izražaja *CRKL* nalazi se u bubregu zahvaćenom CAKUT-om i u kontroli.
5. *UBASH3A* je izražen u glomerulima i tubulima u ispitanika s DS i CAKUT fenotipom, ali je različit u intenzitetu, raspodjeli i količini u usporedbi s kontrolom. U jezgrama displastičnog bubrega u DS izražaj *UBASH3A* je zrnat, raspršen i slabiji nego u kontroli gdje je jedan jasan točkasti signal.
6. U ispitanika s podocitopatijama nije nađen pozitivan izražaj *UBASH3A* za razliku od kontrole.

## **7. SAŽETAK**

CAKUT je skraćenica za kongenitalne anomalije bubrega i urološkog trakta. U ovoj retrospektivnoj studiji istražen je mRNA transkript i prostorno-vremenski obrazac izražaja proteinskog produkta tri CAKUT kandidat gena, *CRKL*, *UBASH3A* i *AIFM3* na uzorcima humanog bubrega u razvoju i uspoređeni s obrascem izražaja u CAKUT-u i podocitopatijama. Izražaj njihovih proteina analiziran je imunofluorescencijom na 14 bubrega u razvoju, 28 CAKUT-a i 10 podocitopatija, a transkripti mRNA RT-qPCR-a na uzorcima humanog bubrega u razvoju.

Izražaj *AIFM3* bio je pretežito u tubulima, a manje u glomerulima i maksimalan u neonatalnom razdoblju (Ph4 1M), moguće zbog uloge *AIFM3* u energetske metabolizmu. Kolokalazacija *AIFM3* i *AIF* je bila općenito slaba, najčešće nađena u Ph4 1M. Izražaj *UBASH3A* nađen je u svim razvojnim fazama u strukturama nefrona i stanicama tubula, a najveći u prenatalnoj Ph4 kad fetus najbrže raste. U nezrelim glomerulima *UBASH3A* je nađen u podocitima. *CRKL* je bio izražen rijetko, ali intenzivno u pojedinačnim stanicama, najviše u Ph3 kad se formira većina nefrona.

Istraživanjem prostornog izražaja *AIFM3* i *CRKL* u bubrezima i mokraćovodima 28 ispitanika s CAKUT fenotipom, metodom imunofluorescencije nađen je pojačani izražaj *AIFM3* u epitelu s prekomjernom proliferacijom i apoptozom. *CRKL* je imao isti točkasti obrazac izražaja u bubregu zahvaćenom CAKUT-om i kontroli pa se može pretpostaviti da normalno obavlja svoju ulogu u ispitanika s CAKUT-om. *UBASH3A* je bio izražen u ispitanika s DS i CAKUT fenotipom, ali različito od kontrole u intenzitetu izražaja, raspodjeli i količini. Mogući razlozi su veliki broj abnormalnih produkata gena i/ili apoptotski procesi zbog uloge *UBASH3A* u pojačavanju apoptoze ovisne o *AIF*-u. Za razliku od kontrole, u podocitopatijama je utvrđen negativan izražaj *UBASH3A*.

Dinamika i obrazac izražaja *CRKL*, *UBASH3A* i *AIFM3* u različitim strukturama tijekom razvoja humanog bubrega razlikuju se od obrasca u bolesti i ukazuju na ulogu *CRKL*, *UBASH3A* i *AIFM3* gena u nastanku CAKUT-a.

## **8. SUMMARY**

CAKUT is an acronym for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. The aim of this retrospective study was to analyze the mRNA transcript and the spatio-temporal pattern of expression of the protein products of the *CRKL*, *UBASH3A* and *AIFM3* genes in developing human kidneys as candidate genes for CAKUT and to compare the normal pattern of their protein products with those in CAKUT and podocytopathies.

Immunofluorescent protein levels were analyzed in kidney tissue in 14 developing kidneys, 28 CAKUT and 10 podocytopathies, and mRNA transcripts by RT-qPCR in 14 developing kidneys. The results were analyzed using the GraphPad statistical program and  $p < 0.05$  was selected as the significant difference.

*AIFM3* was found predominantly in tubules and less in glomeruli and was maximally expressed in the neonatal period (Ph4 1M), probably due to the role of *AIFM3* in energy metabolism. Co-localization of *AIFM3* and *AIF* was generally weak, most commonly found in Ph4 1M. *UBASH3A* expression was found in all stages and structures of the nephron, the highest in prenatal Ph4 when growth is fastest. In glomeruli, *UBASH3A* was found in podocytes. *CRKL* is rarely but intensely expressed in certain cells, mainly in Ph3, when most nephrons are formed.

In 28 patients with the CAKUT phenotype, increased expression of *AIFM3* was found in the epithelium with excessive proliferation and apoptosis. *CRKL* had the same punctate nuclear pattern as in the control, so it can be assumed that it performs its role normally in patients with CAKUT. *UBASH3A* was expressed in a patient with DS and CAKUT phenotypes, but differently from the control regarding expression intensity, distribution and quantity. Possible reasons are a large number of abnormal gene products and/or apoptotic processes due to the role of *UBASH3A* in enhancing *AIF*-dependent apoptosis. In contrast to the control, a negative expression of *UBASH3A* was found in podocytopathies.

The dynamics of expression of *CRKL*, *UBASH3A* and *AIFM3* in different structures in the development of the human kidney and the difference from the pathological pattern indicate their role in the development of CAKUT..

## **9. POPIS LITERATURE**



1. A History of Embryology (1959), by Joseph Needham | The Embryo Project Encyclopedia [Internet]. [cited 2022 May 21]. Available from: <https://embryo.asu.edu/pages/history-embryology-1959-joseph-needham>
2. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Before we are born : essentials of embryology and birth defects. In: 9th ed. p. 161–9.
3. Sampaio FJB. Renal anatomy. Endourologic considerations. Urol Clin North Am [Internet]. 2000 [cited 2022 May 23];27(4):585–607. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11098758/>
4. Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. AORN J [Internet]. 1998 [cited 2022 May 23];68(5):799–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9829131/>
5. Kanzaki G, Tsuboi N, Shimizu A, Yokoo T. Human nephron number, hypertension, and renal pathology. Anat Rec (Hoboken) [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 May 23];303(10):2537–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31729838/>
6. Zhuo JL, Li XC. Proximal nephron. Compr Physiol [Internet]. 2013 [cited 2022 May 23];3(3):1079–123. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897681/>
7. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, et al. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. J Cell Physiol [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 May 23];227(3):1257–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21830217/>
8. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. Curr Top Dev Biol [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 May 23];117:31–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26969971/>
9. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: the sphere of influence. Clin J Am Soc Nephrol [Internet]. 2014 [cited 2022 May 23];9(8):1461–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24875196/>
10. Little MH. Kidney development, disease, repair and regeneration. Kidney Dev Dis Repair Regen. 2015 Jan 1;1–614.
11. JB B. Growth and death in the developing mammalian kidney: signals, receptors and conversations. Bioessays [Internet]. 2002 [cited 2021 Jul 23];24(1):72–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782952/>
12. Potter EL. Normal and abnormal development of the kidney. Year Book Medical Publishers; 1972. 305 p.
13. A S. Renal abnormalities and their developmental origin. Nat Rev Genet [Internet]. 2007 Oct [cited 2021 Jul 23];8(10):791–802. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17878895/>
14. Murugapoopathy V, Gupta IR. A Primer on Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tracts (CAKUT). Clin J Am Soc Nephrol [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 May 10];15(5):723. Available from: [/pmc/articles/PMC7269211/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35122119/)
15. Kagan M, Pleniceanu O, Vivante A. The genetic basis of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. Pediatr Nephrol [Internet]. 2022 [cited 2022 May 10]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35122119/>
16. Sanna-Cherchi S, Westland R, Ghiggeri GM, Gharavi AG. Genetic basis of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract. J Clin Invest [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2022 May

- 10];128(1):4. Available from: [/pmc/articles/PMC5749511/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31343747/)
17. Talati AN, Webster CM, Vora NL. Prenatal genetic considerations of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Prenat Diagn* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 May 23];39(9):679–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31343747/>
  18. Van De Hoek G, Nicolaou N, Giles RH, Knoers NVAM, Renkema KY, Bongers EMHF. Functional models for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nephron* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 May 10];129(1):62–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25531169/>
  19. Blaine J, Dylewski J. Regulation of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *Cells* [Internet]. 2020 Jul 16 [cited 2022 May 23];9(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32708597/>
  20. Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2012 May [cited 2022 May 23];8(5):293–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22349487/>
  21. Maas RJ, Deegens JK, Smeets B, Moeller MJ, Wetzels JF. Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2022 May 23];12(12):768–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27748392/>
  22. Bose B, Cattran D. Glomerular diseases: FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2014 Mar 7 [cited 2022 May 23];9(3):626–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23990165/>
  23. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F. Minimal Change Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017 [cited 2022 May 23];12(2):332–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27940460/>
  24. Xie Q, Lin T, Zhang Y, Zheng J, Bonanno JA. Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 May 20 [cited 2022 May 27];280(20):19673–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15764604/>
  25. Novo N, Ferreira P, Medina M. The apoptosis-inducing factor family: Moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei. *IUBMB Life* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 May 29];73(3):568–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33035389/>
  26. Klim J, Gladki A, Kucharczyk R, Zielenkiewicz U, Kaczanowski S. Ancestral State Reconstruction of the Apoptosis Machinery in the Common Ancestor of Eukaryotes. *G3 (Bethesda)* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 May 29];8(6):2121–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29703784/>
  27. Lienhart WD, Gudipati V, MacHeroux P. The human flavoproteome. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 29];535(2):150–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23500531/>
  28. Chua-On D, Proungvitaya T, Techasen A, Limpaboon T, Roytrakul S, Tummanatsakun D, et al. Bioinformatic Prediction of Novel Signaling Pathways of Apoptosis-inducing Factor, Mitochondrion-associated 3 (AIFM3) and Their Roles in Metastasis of Cholangiocarcinoma Cells. *Cancer Genomics Proteomics* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 May 31];19(1):35. Available from: [/pmc/articles/PMC8717952/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38717952/)
  29. del Caño-Ochoa F, Ramón-Maiques S. Deciphering CAD: Structure and function of a mega-enzymatic pyrimidine factory in health and disease. *Protein Sci* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited

- 2022 May 31];30(10):1995. Available from: [/pmc/articles/PMC8442968/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2903106/)
30. Chaparian MG, Evans DR. Intracellular location of the multidomain protein CAD in mammalian cells. *FASEB J* [Internet]. 1988 Nov [cited 2022 May 31];2(14):2982–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2903106/>
  31. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2007 [cited 2022 May 29];35(4):495. Available from: [/pmc/articles/PMC2117903/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16270150/)
  32. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* [Internet]. 2005 Nov [cited 2022 May 29];37(11):719–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16270150/>
  33. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 May 29];43(6):582–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>
  34. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 May 29];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30792387/>
  35. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* [Internet]. 2001 Mar 29 [cited 2022 May 29];410(6828):549–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11279485/>
  36. Holubec H, Payne CM, Bernstein H, Dvorakova K, Bernstein C, Waltmire CN, et al. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2005 Feb [cited 2022 May 29];53(2):229–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684335/>
  37. Priante G, Gianesello L, Ceol M, Del Prete D, Anglani F. Cell Death in the Kidney. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 2 [cited 2022 May 29];20(14). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31340541/>
  38. A O, C L, MP C, P J, J E. Role and regulation of apoptotic cell death in the kidney. Y2K update. *Front Biosci* [Internet]. 2000 [cited 2022 May 29];5(1):d735. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10922294/>
  39. Savill J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1994 Jul [cited 2022 May 29];5(1):12–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7948779/>
  40. Carev D, Krnić D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babić M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2006 May [cited 2022 May 29];21(5):627–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568307/>
  41. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* [Internet]. 1993 Oct 22 [cited 2022 May 29];75(2):229–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8402909/>
  42. Berg Jeremy M., Tymoczko John L., Gatto Jr. Gregory J. SL. *Biochemistry*. 7th ed. W H Freeman, editor. 2019. 1254 p.
  43. Hangen E, Féraud O, Lachkar S, Mou H, Doti N, Fimia GM, et al. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Mol Cell* [Internet]. 2015 Jun 18 [cited 2022

- May 29];58(6):1001–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26004228/>
44. Delavallée L, Mathiah N, Cabon L, Mazeraud A, Brunelle-Navas MN, Lerner LK, et al. Mitochondrial AIF loss causes metabolic reprogramming, caspase-independent cell death blockade, embryonic lethality, and perinatal hydrocephalus. *Mol Metab* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 May 29];40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32480041/>
  45. Murata Y, Furuyama I, Oda S, Mitani H. A novel Rieske-type protein derived from an apoptosis-inducing factor-like (AIFL) transcript with a retained intron 4 induces change in mitochondrial morphology and growth arrest. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2022 May 29];407(1):92–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376015/>
  46. Woodward KJ, Stampalia J, Vanyai H, Rijhumal H, Potts K, Taylor F, et al. Atypical nested 22q11.2 duplications between LCR22B and LCR22D are associated with neurodevelopmental phenotypes including autism spectrum disorder with incomplete penetrance. *Mol Genet genomic Med* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2022 May 29];7(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30614210/>
  47. Forsyth JK, Mennigen E, Lin A, Sun D, Vajdi A, Kushan-Wells L, et al. Prioritizing Genetic Contributors to Cortical Alterations in 22q11.2 Deletion Syndrome Using Imaging Transcriptomics. *Cereb Cortex* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 May 29];31(7):3285–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33638978/>
  48. AIFM3 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 May 29]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183773-AIFM3>
  49. Lopez-Rivera E, Liu YP, Verbitsky M, Anderson BR, Capone VP, Otto EA, et al. Genetic Drivers of Kidney Defects in the DiGeorge Syndrome. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Feb 23 [cited 2022 May 10];376(8):742. Available from: </pmc/articles/PMC5559731/>
  50. Tissue expression of AIFM1 - Staining in kidney - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 May 29]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000156709-AIFM1/tissue/kidney#img>
  51. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2007 Oct 20 [cited 2022 Jun 6];370(9596):1443–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17950858/>
  52. McDonald-McGinn DM, LaRossa D, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, et al. The 22q11.2 deletion: Screening, diagnostic workup, and outcome of results; report on 181 patients. *Genet Test*. 1997;1(2):99–108.
  53. Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* [Internet]. 1997 [cited 2022 Jun 6];34(10):798–804. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9350810/>
  54. Kujat A, Schulz MD, Strenge S, Froster UG. Renal malformations in deletion 22q11.2 patients. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2006 Jul 15 [cited 2022 May 29];140(14):1601–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16761295/>
  55. Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Curr Opin Pediatr*. 2002 Dec;14(6):678–83.
  56. Fischer M, Klopocki E. Atypical 22q11.2 Microduplication with “Typical” Signs and Overgrowth. *Cytogenet Genome Res* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 May 29];160(11–

- 12):659–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33472199/>
57. Feller SM. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2022 Jun 8];20(44):6348–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11607838/>
  58. Sattler M, Salgia R. Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia* [Internet]. 1998 [cited 2022 Jun 8];12(5):637–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9593259/>
  59. RB B, C K, F I, S T. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 23];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426560/>
  60. K S, J H, CL S. The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 [cited 2021 Jul 23];271(38):23255–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8798523/>
  61. Saini P, Courtneidge SA. Tks adaptor proteins at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Jun 8];131(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29311151/>
  62. J D, L M, L P, B J, N D, C H, et al. Crk1/2 and CrkL play critical roles in maintaining podocyte morphology and function. *Exp Cell Res* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Jul 23];394(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32535035/>
  63. AM M, DL G, JH S, L L, J H, A T, et al. Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Dev Cell* [Internet]. 2006 Jan [cited 2021 Jul 23];10(1):71–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16399079/>
  64. Cai L, Wang H, Yang Q. CRKL overexpression promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in endometrial carcinoma. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Jun 8];13(1):51–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28123521/>
  65. Ota J, Kimura F, Sato K, Wakimoto N, Nakamura Y, Nagata N, et al. Association of CrkL with STAT5 in hematopoietic cells stimulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or erythropoietin. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1998 Nov 27 [cited 2022 Jun 8];252(3):779–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9837784/>
  66. Shi X, Pan S, Li Y, Ma W, Wang H, Xu C, et al. Xanthoplanine attenuates macrophage polarization towards M1 and inflammation response via disruption of CrkL-STAT5 complex. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2022 Jun 8];683. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142888/>
  67. B G, Q F, CP D, AA S, J Z, R V, et al. Crk1/2 and CrkL form a hetero-oligomer and functionally complement each other during podocyte morphogenesis. *Kidney Int* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 23];85(6):1382–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24499776/>
  68. Han B, Luan L, Xu Z, Wu B. Clinical significance and biological roles of CRKL in human bladder carcinoma. *Tumor Biol* [Internet]. 2014 May 28 [cited 2022 Jun 8];35(5):4101–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-013-1536-y>
  69. Kumar S, Fajardo JE, Birge RB, Sriram G. Crk at the Quarter Century Mark: Perspectives in Signaling and Cancer. *J Cell Biochem* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2022 Jun 8];115(5):819–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.24749>
  70. Wang J, Che YL, Li G, Liu B, Shen TM, Wang H, et al. Crk and CrkL present with different expression and significance in epithelial ovarian carcinoma. *Mol Carcinog* [Internet]. 2011 Jul

- [cited 2022 Jun 8];50(7):506–15. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21319228/>
71. Kim YH, Kwei KA, Girard L, Salari K, Kao J, Pacyna-Gengelbach M, et al. Genomic and functional analysis identifies CRKL as an oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene* [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Jun 8];29(10):1421–30. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19966867/>
  72. Fu L, Dong Q, Xie C, Wang Y, Li Q. CRKL protein overexpression enhances cell proliferation and invasion in pancreatic cancer. *Tumor Biol* [Internet]. 2015 Feb 16 [cited 2022 Jun 8];36(2):1015–22. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-014-2706-2>
  73. Lan B. Downregulation of CRKL expression can inhibit tumorigenesis in colon cancer. *Front Biosci* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 8];19(3):528. Available from:  
<https://imrpess.com/journal/FBL/19/3/10.2741/4223>
  74. Park T, Large N, Curran T. Quantitative assessment of glioblastoma phenotypes in vitro establishes cell migration as a robust readout of Crk and CrkL activity. *J Biol Chem* [Internet]. 2021 Jan [cited 2022 Jun 8];296:100390. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925821001629>
  75. Yanagi H, Wang L, Nishihara H, Kimura T, Tanino M, Yanagi T, et al. CRKL plays a pivotal role in tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma through the regulation of cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Jun 8];418(1):104–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X11023643>
  76. Wang Y, Dong Q, Fu L, Stoecker M, Wang E, Wang E-H. Overexpression of crkl correlates with poor prognosis and cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* [Internet]. 2013 Nov [cited 2022 Jun 8];52(11):890–9. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.21935>
  77. Natsume H, Shinmura K, Tao H, Igarashi H, Suzuki M, Nagura K, et al. The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2012 Dec 16 [cited 2022 Jun 8];10(1):97. Available from:  
<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-10-97>
  78. Guo C, Gao C, Lv X, Zhao D, Greenaway FT, Hao L, et al. CRKL promotes hepatocarcinoma through enhancing glucose metabolism of cancer cells via activating PI3K/Akt. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2021 Mar [cited 2022 Jun 8];25(5):2714–24. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.16303>
  79. Liu C-H, Chen T-C, Chau G-Y, Jan Y-H, Chen C-H, Hsu C-N, et al. Analysis of Protein-Protein Interactions in Cross-talk Pathways Reveals CRKL Protein as a Novel Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Jun 8];12(5):1335–49. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535947620311154>
  80. Wang J, Wang C, Li Q, Guo C, Sun W, Zhao D, et al. miR-429-CRKL axis regulates clear cell renal cell carcinoma malignant progression through SOS1/MEK/ERK/MMP2/MMP9 pathway. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jun 8];127. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32413671/>
  81. Hall G, Routh JC, Gbadegesin RA. Urinary Anomalies in 22q11.2 Deletion (DiGeorge syndrome): From Copy Number Variations to Single-Gene Determinants of Phenotype. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Jun 6];70(1):8–10. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28456345/>

82. Tissue expression of CRKL - Staining in kidney - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 Jun 6]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000099942-CRKL/tissue/kidney#img>
83. Park T, Koptyra M, Curran T. Fibroblast Growth Requires CT10 Regulator of Kinase (Crk) and Crk-like (CrkL). *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Dec 16 [cited 2022 Jun 8];291(51):26273–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27807028/>
84. Park TJ, Curran T. Essential roles of Crk and CrkL in fibroblast structure and motility. *Oncogene* [Internet]. 2014 Oct 23 [cited 2022 Jun 8];33(43):5121–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24166500/>
85. TJ P, T C. Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway. *J Neurosci* [Internet]. 2008 Dec 10 [cited 2021 Jul 23];28(50):13551–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074029/>
86. 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 Dec 1;60(6):521–31.
87. Racetin A, Filipović N, Lozić M, Ogata M, Ensor LG, Kelam N, et al. A homozygous *dab1*<sup>-/-</sup> is a potential novel cause of autosomal recessive congenital anomalies of the mice kidney and urinary tract. *Biomolecules*. 2021 Apr 1;11(4).
88. Feshchenko EA, Smirnova E V., Swaminathan G, Teckchandani AM, Agrawal R, Band H, et al. TULA: an SH3- and UBA-containing protein that binds to c-Cbl and ubiquitin. *Oncogene* [Internet]. 2004 Jun 10 [cited 2022 Jun 8];23(27):4690–706. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15107835/>
89. Ge Y, Paisie TK, Newman JRB, McIntyre LM, Concannon P. UBASH3A Mediates Risk for Type 1 Diabetes Through Inhibition of T-Cell Receptor-Induced NF- $\kappa$ B Signaling. *Diabetes* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Jun 8];66(7):2033–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28607106/>
90. Hoeller D, Hecker CM, Dikic I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 Jun 8];6(10):776–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16990855/>
91. Kowanetz K, Crosetto N, Haglund K, Schmidt MHH, Heldin CH, Dikic I. Suppressors of T-cell receptor signaling *Sts-1* and *Sts-2* bind to Cbl and inhibit endocytosis of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Jul 30 [cited 2022 Jun 8];279(31):32786–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15159412/>
92. Bertelsen V, Breen K, Sandvig K, Stang E, Madshus IH. The Cbl-interacting protein TULA inhibits dynamin-dependent endocytosis. *Exp Cell Res* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2022 Jun 8];313(8):1696–709. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17382318/>
93. Agrawal R, Carpino N, Tsygankov A. TULA proteins regulate activity of the protein tyrosine kinase Syk. *J Cell Biochem* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2022 Jun 8];104(3):953–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18189269/>
94. Mikhailik A, Ford B, Keller J, Chen Y, Nassar N, Carpino N. A phosphatase activity of *Sts-1* contributes to the suppression of TCR signaling. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Aug 3 [cited 2022 Jun 8];27(3):486–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17679096/>
95. San Luis B, Sondgeroth B, Nassar N, Carpino N. *Sts-2* is a phosphatase that negatively regulates zeta-associated protein (ZAP)-70 and T cell receptor signaling pathways. *J Biol Chem*

- [Internet]. 2011 May 6 [cited 2022 Jun 8];286(18):15943–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21393235/>
96. Chen Y, Jakoncic J, Parker KA, Carpino N, Nassar N. Structures of the phosphorylated and VO(3)-bound 2H-phosphatase domain of Sts-2. *Biochemistry* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2022 Jun 8];48(34):8129–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19627098/>
  97. Chen Y, Jakoncic J, Carpino N, Nassar N. Structural and functional characterization of the 2H-phosphatase domain of Sts-2 reveals an acid-dependent phosphatase activity. *Biochemistry* [Internet]. 2009 Mar 3 [cited 2022 Jun 8];48(8):1681–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19196006/>
  98. Brehme M, Hantschel O, Colinge J, Kaupé I, Planyavsky M, Köcher T, et al. Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 May 5 [cited 2022 Jun 8];106(18):7414–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19380743/>
  99. Ge Y, Paisie TK, Newman JRB, McIntyre LM, Concannon P. UBASH3A mediates risk for type 1 diabetes through inhibition of T-cell receptor-induced NF- $\kappa$ B signaling. *Diabetes*. 2017 Jul 1;66(7):2033–43.
  100. Ge Y, Paisie TK, Chen S, Concannon P. UBASH3A Regulates the Synthesis and Dynamics of TCR–CD3 Complexes. *J Immunol*. 2019 Dec 1;203(11):2827–36.
  101. Steck AK, Dong F, Wong R, Fouts A, Liu E, Romanos J, et al. Improving prediction of type 1 diabetes by testing non-HLA genetic variants in addition to HLA markers. *Pediatr Diabetes* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 8];15(5):355–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25075402/>
  102. Plagnol V, Howson JMM, Smyth DJ, Walker N, Hafler JP, Wallace C, et al. Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. *PLoS Genet*. 2011 Aug;7(8).
  103. Grant SFA, Qu HQ, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, et al. Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Jun 8];58(1):290–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18840781/>
  104. Frederiksen B, Kroehl M, Lamb MM, Seifert J, Barriga K, Eisenbarth GS, et al. Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA Pediatr*. 2013 Sep;167(9):808–15.
  105. Zhernakova A, Stahl EA, Trynka G, Raychaudhuri S, Festen EA, Franke L, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies in celiac disease and rheumatoid arthritis identifies fourteen non-HLA shared loci. *PLoS Genet*. 2011 Feb;7(2).
  106. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Gowan K, Riccardi SL, Holland PJ, et al. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 May 6 [cited 2022 Jun 8];362(18):1686–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410501/>
  107. Liu J, Liu J, Ni J, Leng RX, Pan HF, Ye DQ. Association of UBASH3A gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Gene*. 2015 Jul 1;565(1):116–21.
  108. Liu J, Ni J, Li LJ, Leng RX, Pan HF, Ye DQ. Decreased UBASH3A mRNA Expression Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Inflammation*. 2015 Oct 10;38(5):1903–10.



109. Diaz-Gallo LM, Sánchez E, Ortego-Centeno N, Sabio JM, García-Hernández FJ, de Ramón E, et al. Evidence of New Risk Genetic Factor to Systemic Lupus Erythematosus: The UBASH3A Gene. *PLoS One*. 2013 Apr 2;8(4).
110. Li Y, Cheng H, Xiao FL, Liang B, Zhou FS, Li P, et al. Association of UBASH3A gene polymorphism and atopic dermatitis in the Chinese Han population. *Genes Immun* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2022 Jun 8];18(3):158–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747736/>
111. Tsygankov AY. TULA-family proteins: an odd couple. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2009 Sep [cited 2022 Jun 8];66(17):2949–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19585081/>
112. Cuadrado E, Barrena MJ. Immune dysfunction in Down’s syndrome: primary immune deficiency or early senescence of the immune system? *Clin Immunol Immunopathol* [Internet]. 1996 [cited 2022 Jun 8];78(3):209–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8605695/>
113. Murphy M, Insoft RM, Pike-Nobile L, Epstein LB. A hypothesis to explain the immune defects in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* [Internet]. 1995 [cited 2022 Jun 8];393:147–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8545448/>
114. AY T. TULA proteins as signaling regulators. *Cell Signal* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Jul 23];65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31639493/>
115. Wattenhofer M, Shibuya K, Kudoh J, Lyle R, Michaud J, Rossier C, et al. Isolation and characterization of the UBASH3A gene on 21q22.3 encoding a potential nuclear protein with a novel combination of domains. *Hum Genet* [Internet]. 2001 [cited 2022 Jun 8];108(2):140–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11281453/>
116. J A, KS H, JH H, D B, YH K, HA J, et al. FOXC2 and CLIP4 : a potential biomarker for synchronous metastasis of ≤7-cm clear cell renal cell carcinomas. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 Jul 23];7(32):51423–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27283491/>
117. Collingwood TS, Smirnova E V., Bogush M, Carpino N, Annan RS, Tsygankov AY. T-cell ubiquitin ligand affects cell death through a functional interaction with apoptosis-inducing factor, a key factor of caspase-independent apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Oct 19 [cited 2022 Jun 8];282(42):30920–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17709377/>
118. Kupferman JC, Druschel CM, Kupchik GS. Increased prevalence of renal and urinary tract anomalies in children with Down syndrome. *Pediatrics* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jun 8];124(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19752083/>
119. Niamien-Attai C, Bacchetta J, Ranchin B, Sanlaville D, Cochat P. [Renal abnormalities in Down syndrome: A review]. *Arch Pediatr* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Jun 8];24(10):1013–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893484/>
120. Postolache L, Parsa A, Simoni P, Boitsios G, Ismaili K, Schurmans T, et al. Widespread kidney anomalies in children with Down syndrome. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35118542/>
121. Ariel I, Wells TR, Landing BH, Singer DB. The urinary system in Down syndrome: a study of 124 autopsy cases. *Pediatr Pathol* [Internet]. 1991 [cited 2022 Jun 8];11(6):879–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1837925/>
122. Stoll C, Dott B, Alembik Y, Roth MP. Associated congenital anomalies among cases with Down

- syndrome. *Eur J Med Genet* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jun 8];58(12):674–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26578241/>
123. Málaga S, Pardo R, Málaga I, Orejas G, Fernández-Toral J. Renal involvement in Down syndrome. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2005 May [cited 2022 Jun 8];20(5):614–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15785939/>
  124. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet*. 2003 Apr 12;361(9365):1281–9.
  125. Antonarakis SE, Skotko BG, Ruffolo MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, et al. Down syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2020 Jan 1;6(1).
  126. Bull MJ. Down Syndrome. Ropper AH, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2022 Jun 8];382(24):2344–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1706537>
  127. Desai SS. Down syndrome: A review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(3):279–85.
  128. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 8];1897:289–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30539453/>
  129. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 8];1180:31–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25015141/>
  130. Gadkar VJ, Filion M. New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 8];16(1):1–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23562919/>
  131. Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomol Detect Quantif*. 2014 Sep 1;1(1):23–33.
  132. Herath S, Dai H, Erlich J, Au AYM, Taylor K, Succar L, et al. Selection and validation of reference genes for normalisation of gene expression in ischaemic and toxicological studies in kidney disease. *PLoS One* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Jun 8];15(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32437461/>
  133. Cui X, Zhou J, Qiu J, Johnson MR, Mrug M. Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. *Am J Nephrol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2022 Jun 8];30(5):413–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19729889/>
  134. Feuer R, Vlaic S, Arlt J, Sawodny O, Dahmen U, Zanger UM, et al. LEMming: A Linear Error Model to Normalize Parallel Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Data as an Alternative to Reference Gene Based Methods. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Jun 8];10(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26325269/>
  135. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet* [Internet]. 2013 Oct [cited 2022 Jun 8];29(10):569–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23810203/>
  136. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001 [cited 2022 Jun 8];25(4):402–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>
  137. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jun 8];13:134. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22708584/>

138. Kujat A, Schulz MD, Strenge S, Froster UG. Renal malformations in deletion 22q11.2 patients. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2006 Jul 15 [cited 2022 Jun 6];140(14):1601–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16761295/>
139. Quigley R. Developmental changes in renal function. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Jun 8];24(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22426155/>
140. Bard JBL. Growth and death in the developing mammalian kidney: signals, receptors and conversations. *Bioessays* [Internet]. 2002 [cited 2022 Jun 8];24(1):72–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782952/>
141. Hall JE. *Guyton and hall textbook of medical physiology, 13th ed.*/ Hall, John E. *Guyt Hall Textb Med Physiol* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jun 8];1(1):112–20. Available from: [https://books.google.com/books/about/Guyton\\_and\\_Hall\\_Textbook\\_of\\_Medical\\_Phys.html?id=3sWNCgAAQBAJ](https://books.google.com/books/about/Guyton_and_Hall_Textbook_of_Medical_Phys.html?id=3sWNCgAAQBAJ)
142. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 16e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical [Internet]. 16th ed. [cited 2022 Jun 8]. 98–101 p. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=3047>
143. Schwartz GJ, Evan AP. Development of solute transport in rabbit proximal tubule. I. HCO<sub>3</sub>- and glucose absorption. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1983;14(3).
144. GJ S, AP E. Development of solute transport in rabbit proximal tubule. III. Na-K-ATPase activity. *Am J Physiol* [Internet]. 1984 [cited 2021 Jul 23];246(6 Pt 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6331174/>
145. Horster M, Schmid H, Schmidt U. Aldosterone in vitro restores nephron Na-K-ATPase of distal segments from adrenalectomized rabbits. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 1980 Apr;384(3):203–6.
146. Schmidt U, Horster M. Na-K-activated ATPase: activity maturation in rabbit nephron segments dissected in vitro. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol*. 1977;233(1).
147. Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Dec 1;27(12):639–45.
148. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 27];94:909–50. Available from: [www.prv.org](http://www.prv.org)
149. Novo N, Ferreira P, Medina M. The apoptosis-inducing factor family: Moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei. *IUBMB Life*. 2021 Mar 1;73(3):568–81.
150. Stuart RO, Bush KT, Nigam SK. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 May 8 [cited 2022 Jun 8];98(10):5649–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331749/>
151. Araki T, Saruta T, Okano H, Miura M. Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. *Exp Cell Res* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2022 Jun 8];248(2):423–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10222134/>
152. Carev D, Krnić D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babić M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2006 May [cited 2022 Jun 8];21(5):627–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568307/>
153. Woolf AS, Welham SJM. Cell turnover in normal and abnormal kidney development. *Nephrol*

- Dial Transplant [Internet]. 2002 [cited 2022 Jun 7];17 Suppl 9(SUPPL. 9):2–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12386272/>
154. Phua YL, Ho J. Renal Dysplasia in the Neonate. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Jun 7];28(2):209. Available from: </pmc/articles/PMC4809249/>
  155. Phua YL, Ho J. Renal Dysplasia in the Neonate. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Jun 8];28(2):209. Available from: </pmc/articles/PMC4809249/>
  156. Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJD. Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2022 Jun 7];15(4):998–1007. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034102/>
  157. De Winter D, Salaets T, Gie A, Deprest J, Levtschenko E, Toelen J. Glomerular developmental delay and proteinuria in the preterm neonatal rabbit. *PLoS One* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Jun 7];15(11):e0241384. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0241384>
  158. R de J, J ten H, N H, J G. Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jul 27];270(37):21468–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7545163/>
  159. Garg P. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Jun 8];47 Suppl 1:3–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29852492/>
  160. Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet* [Internet]. 2001 [cited 2022 Jun 8];27(3):293–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11242111/>
  161. Khoshdel Rad N, Aghdami N, Moghadasali R. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Development: From the Embryo to the Kidney Organoid. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Mar 24;8:183.

## **10. KRATKI ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODATCI**

Ime i prezime: Mirela Lozić

Državljanstvo: hrvatsko

## **IZOBRAZBA**

2019. Poslijediplomski studij „Biologija novotvorina”, Sveučilište u Splitu Medicinski fakultet

2017. Magistra farmacije, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

## **MATERINSKI JEZIK**

Hrvatski

## **OSTALI JEZICI**

Engleski

## **RADNO ISKUSTVO**

2019. – danas Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, znanstveni novak

2018. – 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju, asistent na studiju Medicina na engleskom jeziku

2018. – 2019. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju, asistent u nastavi

2017. dm-drogerie markt d.o.o., magistra farmacije

## **ČLANSTVA**

2021. – danas Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), članica.

2017. – danas Hrvatska ljekarnička komora (HLJK), članica.