

# Genska ekspresija koneksina Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 i paneksina 1 (Panx1) u razvoju jetre yotari (Dab1-/-) miševa

---

**Paštar, Vlatka**

**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:171:730291>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**VLATKA PAŠTAR, mag. biol. et chem.**

**GENSKA EKSPRESIJA KONEKSINA Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 I  
PANEKSINA 1 (Panx1) U RAZVOJU JETRE YOTARI (Dab1-/-) MIŠEVA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**VLATKA PAŠTAR, mag. biol. et chem.**

**GENSKA EKSPRESIJA KONEKSINA Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 I  
PANEKSINA 1 (Panx1) U RAZVOJU JETRE YOTARI (Dab1-/-) MIŠEVA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2022.**

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Katarini Vukojević, dr. med. na ukazanom povjerenju i podršci tijekom mog poslijediplomskog doktorskog studija.*

*Zahvaljujem Mediteranskom Institutu za istraživanje života (MedILS) na pruženoj prilici za daljnje školovanje i napredovanje.*

*Hvala mom suprugu koji je uvijek vjerovao u mene, najviše i najjače kad ni sama nisam. Hvala mom sinu koji je nesvjesno bodrio mamu, kako iz utrobe tako i nakon dolaska na ovaj svijet.*

*Hvala cijeloj mojoj obitelji, u prvom redu roditeljima koji su mi velika životna podrška i bez kojih ni jedan uspon ne bi bio moguć.*

*Zahvaljujem svim prijateljima, kolegama i onima koji su na bilo koji način bili uključeni u ovaj dio mog životnog puta.*

# SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA.....	4
1. UVOD.....	7
1.1. Koneksini, paneksini i stanična komunikacija u razvoju jetre .....	8
1.2. Embrionalni razvoj jetre u miša, građa i funkcija jetre .....	14
1.3. Reelin signalni put i <i>Dab1</i> <i>-/-</i> ( <i>yotari</i> ) miševi.....	17
2. CILJEVI I HIPOTEZA .....	22
2.1. Ciljevi istraživanja .....	23
2.2. Hipoteza istraživanja .....	23
3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. Etička dozvola.....	25
3.2. Animalni uzorci.....	25
3.3. Imunofluorescencija.....	26
3.4. Hematoksilin-eozin bojanje.....	26
3.5. Imunofluorescencijsko bojanje .....	26
3.6. Svjetlosna fluorescencijska mikroskopija.....	27
3.7. Obrada i analiza dobivenih podataka.....	27
3.8. Statistička obrada podataka.....	27
4. REZULTATI .....	29
4.1. Morfološka građa jetre <i>wild type</i> i <i>yotari</i> miša .....	30
4.2. Izražaj koneksina u embrionalnoj jetri wt i <i>yotari</i> miša .....	31
4.3. Izražaj paneksina 1 (Panx1), inducirajućeg čimbenika apoptoze (AIF) i kaspaze 3 ( <i>cas3</i> ).....	37
4.4. Izražaj reelina (RELN), ERK, mTOR, p38, TGF- $\beta$ 1 i $\alpha$ -SMA .....	41
5. RASPRAVA .....	49
6. ZAKLJUČCI.....	55
SAŽETAK .....	56
SUMMARY .....	57
POPIS LITERATURE.....	58
ŽIVOTOPIS .....	72

## POPIS OZNAKA I KRATICA

2- AP3-2 – aminoetoksidienil borat

aFP –  $\alpha$ -fetoprotein

AIF (engl. *apoptosis-inducing factor*) – čimbenik indukcije apoptoze

Akt – Ser/Thr - kinaza B

ApoEr2 – apolipoprotein receptor 2

ATP – adenzin trifosfat

BMP (engl. *bone morphogenetic protein*) – koštani morfogenetski protein

C3G – čimbenik zamjene gvanina

CamII – kalcij kalmodulin ovisna kinaza

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

Cas3 – kaspaza 3

CBX – karbenoksolon

Cdx (engl. *caudal homologue*) – kaudalni homolog

CK-19 – citokeratin 19

Crk – protoonkogen

Cx (engl. *conexin*) – koneksin

Dab1 – Disabled 1

DDB1 (engl. *damage specific DNA-binding protein 1*) za oštećenje specifičan protein 1 vezan za DNA

Dlgh1 (engl. *Discs-large homolog 1*)

E – embrionalni dan

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

EHBD (engl. *extrahepatic bile ducts*) – ekstrahepatični žučni vodovi

EMT – epitelno-mezenhimska pretvorba

ER – endoplazmatska mrežica

ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*) – kinaza regulirana vanstaničnim signalima

FGF (engl. *fibroblast growth factor*) – fibroblastični čimbenik rasta

GJ (engl. *gap junction*) – pukotinasta veza, tijesni spoj

GJIC (engl. *gap junction intercellular communication*) – međustanična komunikacija preko tijesnih spojeva

HC (engl. *hemichannel*) – polukanal

HCC – hepatocelularni karcinom

HE – hematoksilin- eozin

Hhex (engl. *hematopoietically-expressed homeobox*) – hematopoetski izražen homeobox

Hnf4 $\alpha$  (engl. *hepatic nuclear factor 4 $\alpha$* ) – jetreni nuklearni čimbenik 4 $\alpha$

HRZZ – Hrvatska zaklada za znanost

HSC (engl. *hepatic stellate cells*) – zvjezdaste stanice jetre

IHBD (engl. *intrahepatic bile ducts*) – intrahepatični žučni kanalići

IL – interleukin

IP3 – inozitol trifosfat

LDLR (engl. *low-density lipoprotein receptor*) – lipoproteinski receptor niske gustoće

LPS – lipopolisaharid

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

mTOR (engl. *mammalian target of rapamicin*) – sisavačka meta rapamicina

NK cells (engl. *natural killer*) – stanice prirodne ubojice

NLP3 (engl. *pyrin domain-containing protein 3*) – protein 3 koji sadrži pirinsku domenu

NMDAR – N-metil-D-aspartat

OSM – onkostatin M

Panx (engl. *panexin*) – paneksin

PBS (engl. *phosphate buffer saline*) – fiziološka otopina puferirana fosfatnim solima

Pdx1 (engl. *pancreatic duodenum homeobox1*)

PFA – parformaldeid

PI3K – fosfatidil inozitol 3-kinaza

PSD-95 (engl. *postsynaptic density protein 95*) – protein postsinaptičke gustoće 95

PTB (engl. *phosphotyrosine binding domain*) – domena koja veže fosfotirozin

Rap1- protein 1 vezan uz RAS

RELN – reelin

RNAi – RNA inhibitori

ROS (engl. *reactive oxygen species*) – slobodni radikali kisika

STM – lat. *septum transversum mezenhim*, mezenhimalna poprečna pregrada

TGF  $\beta$  (engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) – transformirajući čimbenik rasta  $\beta$

TNF- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) – tumorski čimbenik nekroze  $\alpha$

UTP – uridin trifosfat

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

ZONAB (engl. *ZO-1-associated nucleic acid binding protein*) – protein ZO-1 vezan za DNA

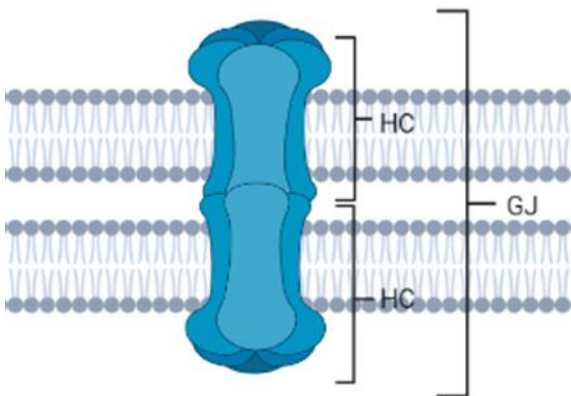
$\alpha$ -SMA (engl. *alpha smooth muscle actin*) – alfa glatkomišićni aktin



# 1. UVOD

## 1.1. Koneksini, paneksini i stanična komunikacija u razvoju jetre

Jetra je jedan od prvih organa u kojem su opisani proteini koneksini (1). Građena je od hepatocita i neparenhimskih stanica u koje spadaju Kupferove stanice, endotel sinusoida, zvjezdaste tzv. Ito stanice, epitel žučnih kanalića i NK stanice (engl. *natural killer*). Stanična komunikacija u jetri je vrlo važna (2,3). Hepatociti komuniciraju preko pukotinastih veza/tijesnih spojeva (engl. *gap junction*, GJ) koji nastaju interakcijom dva polukanala susjednih stanica tzv. koneksiona od kojih svaki sadrži šest koneksina (Slika 1) (4).



Slika 1. Prikaz tijesnog spoja (engl. *gap junction*, GJ) kojeg čine dva koneksiona (polukanala, engl. *hemichannel*, HC) susjednih stanica. Svaki koneksion građen je od šest koneksina koji mogu biti isti (homotipski) ili različiti (heterotipski). Na slici različite boje predstavljaju različite koneksine pa se radi o heterotipskom koneksionu. Slika je izrađena u Biorender programu.

Koneksini su uključeni u stanični rast, diferencijaciju i smrt. Nomenklatura koneksina određena je po molekularnoj masi u kilodaltonima (kDa). U ljudi je poznato preko dvadeset vrsta koneksina, a svi imaju četiri transmembranske domene, dvije ekstracelularne petlje, citoplazmatsku petlju i terminalne domene C i N. Koneksini se međusobno razlikuju po citosolnom dijelu molekule (4). Od dvadeset koneksina u miša i dvadeset i jednog u čovjeka, devetnaest je svrstano po sekvenci u ortologne parove, a neki koneksini prisutni su isključivo u miša, odnosno u čovjeka. Ortologni koneksini u miša i čovjeka nalaze se u različitim tkivima i stanicama, a geni koji ih izražavaju na različitim kromosomima. Nomenklatura koneksina po molekularnoj masi znači primjerice da koneksin 32 (Cx32) ima molekularnu masu 32 kDa. Pored

nomenklature temeljene na molekularnoj masi, u literaturi se koristi i podjela koneksina u podgrupe ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) prema sličnosti sekvence i duljini citoplazmatske domene kao i prema redosljedju njihova otkrivanja, npr. mCx43 je prvi otkriveni koneksin iz  $\alpha$  grupe pa nosi naziv Gja1, a Cx32 prvi otkriveni iz  $\beta$  grupe pa nosi naziv Gjb1 kod miša, odnosno GJB1 kod čovjeka. Građa gena za koneksin je relativno jednostavna. Egzon 1 sadrži 5' UTR netranslatiranu regiju koja je odvojena od kodirajuće regije i sljedeće 3' UTR nekodirajuće regije smještenih na egzonu 2, ali nemaju svi geni za koneksine tu strukturu (5,6).

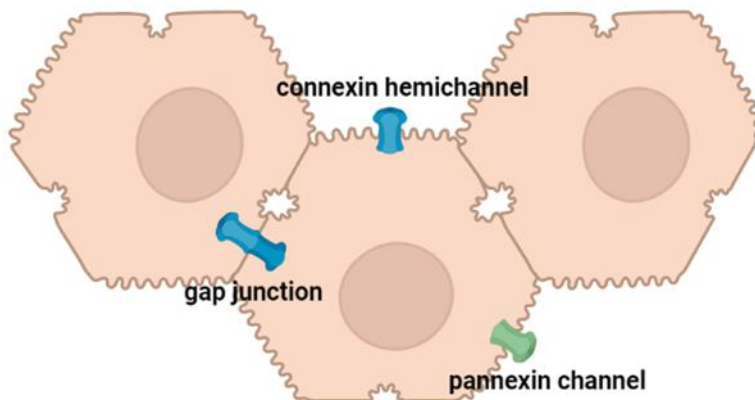
Mjesto oligomerizacije u koneksone ovisi o vrsti koneksina pa se tako Cx43 oligomerizira u trans Golgijevom aparatu, a Cx32 u endoplazmatskoj mrežici (endomplazmatski retikul, ER) ili na oba mjesta. U jetri su oligomeri Cx26 pronađeni u ER/Golgi mreži, a heterotipski oligomeri Cx26 i Cx32 u ER. Konekson Cx26 se posttranslacijski izravno integrira u staničnu membranu. Koneksini putuju do stanične membrane u citoplazmatskim mjehurićima koji se pokreću mikrotubulima. Koneksini imaju relativno kratki poluživot i razgrađuju se u lizosomu i proteasomu (7).

Transmembranski proteini organizirani u obliku GJ omogućuju međustaničnu difuziju malih hidrofilnih molekula veličine  $\leq 1$  kDa u koje spadaju ciklički adenozin monofosfat (cAMP), adenozin trifosfat (ATP), glukoza, glutamat, glutation, inozitol trifosfat (IP3),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i drugi ioni (8,9). Svi koneksini osim Cx26 su fosfoproteini. Međustanična komunikacija preko pukotinastih veza (engl. *gap junction intercellular communication*, GJIC ) je vrlo složena. Fosforilacija koneksina MAP kinazama i kinazama CK1, PKA i PKC služi za brzu kontrolu (engl. *fast control*) u milisekundama (5). Pored fosforilacije, brzu kontrolu GJIC omogućuju posttranslacijske modifikacije kao što su ubikvitinacija, glikolizacija, N-acetilacija, lipidacija, metilacija, hidroksilacija, S-nitrozilacija, deamidacija i sumoilacija (11). Spora kontrola (engl. *long-term*) raspona u satima, odnosi se na regulaciju izražaja gena za koneksin. Osim cis/trans regulacije, prepisivanje gena za koneksin epigenetski se nadzire metilacijom DNA i postranslacijskim modifikacijama histona (4).

GJ zauzimaju 3% membranske površine hepatocita. U jetri je najzastupljeniji koneksin 32 (Cx32), izražen u hepatocitima, epitelu žučnih kanalića i endotelu sinusoida. Koneksin 26 (Cx26) nalazi se u manjoj mjeri u hepatocitima, zvjezdastim Ito stanicama, Kupferovim stanicama i endotelu sinusoida. Koneksini 37 i 40 (Cx37 i Cx40) su izraženi u endotelu hepatalne arterije i portalne vene. U vaskularnim stanicama, Kupferovim stanicama, Ito stanicama i endotelu sinusoida prisutan je koneksin 43 (Cx43) (10).

Tijekom ontogeneze jetre koneksini Cx26 i Cx32 izraženi su u kasnijoj gestacijskoj dobi (E18), a njihova koncentracija značajno naraste dan nakon rođenja. U jetrenim režnjićima se Cx32 nalazi uglavnom u srednjem i pericentralnom dijelu acinusa, a heterotipski GJ građeni od Cx26 i Cx32 periportalno. Cx37 i Cx40 izraženi su već u ranom razvoju ogranaka hepatalne arterije i portalne vene, a Cx43 samo u portalnoj veni (11,12). Tijekom diferencijacije progenitorskih stanica u hepatocite smanjuje se izražaj Cx43, a povećava izražaj Cx26 i osobito Cx32. U proces u uključeni vitamin A,  $\beta$ -karoten i trijodtironin. Cx32 je u jetri raspodijeljen ravnomjerno, a Cx26 uglavnom u periportalnim hepatocitima (12,13). Glukagon je transkripcijski regulator Cx26. GJIC u jetri odraslog čovjeka je ključna za glikogenolizu, izlučivanje žuči i albumina, uklanjanje amonijaka i ksenobiotsku biotransformaciju. Cx32 GJ uključen je u odgovor na glikogenolizu od periportalnog prema pericentralnoj regiji i otpuštanje kalcija iz ER djelovanjem inozitol trifosfata. Cx32 *knock out* miševi nakon glikogenolitičke stimulacije imaju manju razinu glukoze u krvi. Stvaranje i protok žuči u duktulima ovisi o širenju valova kalcija kroz Cx-43 GJ (10).

Paneksini su proteini koji, za razliku od koneksina koji mogu oblikovati polukanale ili GJ, oblikuju samo kanale (14–16) (Slika 2). Panexin kanali i koneksin polukanali sudjeluju u upalnim procesima (13,17,18).



Slika 2. Prikaz tijesnih spojeva hepatocita, polukanala koneksina i kanala paneksina. Na slici se vidi tijesni spoj građen od polukanala susjednih stanica, te polukanali koneksina i kanali paneksina zaduženi za komunikaciju stanice s izvanstaničnim matriksom. Slika je izrađena u Biorender programu.

Obitelj paneksina (Panxs) ima tri člana - paneksin 1 (Panx1), paneksin 2 (Panx2) i paneksin 3 (Panx3) (19). Paneksini su slični koneksinima po građi i propusnosti (16), a u prvo vrijeme povezivani su s ineksinima u beskralježnjaka (14). Panx1 je najviše izražen u slezeni, mozgu, jetri, koži, hrskavici, plućima, crijevu, mjehuru, bubregu, eritrocitima, trombocitima i imunskim stanicama. Panx2 je uglavnom vezan za živčani sustav, iako novija istraživanja ukazuju na njegovu prisutnost u drugim tkivima u miša. Panx3 je izražen u kostima, koži i hrskavici. Posttranslacijske modifikacije kao što su fosforilacija, S-nitrozilacija i N-glikolizacija kontroliraju paneksinske kanale (20). Dok GJ kontroliraju međustaničnu komunikaciju, koneksin polukanali i paneksin kanali kontroliraju komunikaciju između stanice i vanstaničnog matriksa (21). GJ su uglavnom otvoreni u fiziološkim uvjetima, a polukanali za otvaranje trebaju patološki okidač - povećanu depolarizaciju membrane, povišenje koncentracije unutarstaničnog kalcija, smanjenje koncentracije ekstracelularnog kalcija, mehaničku stimulaciju, oksidativni stres, promjene u fosforilaciji koneksina, ishemijsko-reperfuzijska oštećenja i upalni proces (22). Paneksini ne tvore GJ nego ostaju kao kanali. Velika glikozilacija ekstracelularne petlje sterički prikriva dodirivanje paneksin kanala što potencijalno može biti razlog zašto paneksini ne sudjeluju u formiranju GJ, kao i različit broj cisteinskih ostataka ekstracelularne petlje koji kod paneksina iznosi 2, a kod koneksina 3. Naime, cisteinski ostaci tvore disulfidne veze između ekstracelularnih petlji dva proteina što rezultira strukturom beta nabrane ploče u kojoj vodikove veze prilikom spajanja s polukanalom susjedne stanice stabiliziraju nastalu strukturu GJ. Također, postranslacijske modifikacije koneksina i paneksina mogu utjecati na regulaciju (polu)kanala. (15,18,23). Koneksini imaju vrijeme poluživota 1.5 – 5 sati, a paneksini preko 5 sati (18). Paneksini grade N-glikolizirane heksamere (15). Koneksini i paneksini sudjeluju u otpuštanju ATP-a. Kanali paneksina su važni za parakrino signaliziranje i posreduju u transmembranskom transportu  $Ca^{+}$  i ATP-a u patološkim i fiziološkim uvjetima. Paneksini igraju ulogu u vazodilataciji, upali, epilepsiji, supresiji tumora i ishemijskoj smrti neurona (16,18). Stanice u apoptozi otpuštaju ATP i UTP putem paneksin kanala. Utišavanje i potpuni *knock out* PANX1 smanjuje otpuštanje ATP-a i UTP-a, a prekomjerni izražaj PANX1 ima suprotni učinak (17). Paneksini su dio inflamazoma, te sudjeluju u aktivaciji makrofaga i T stanica u upali. Apoptozu obilježava uklanjanje mrtvih stanica u fiziološkim i patološkim uvjetima karakterizirano skvrčavanjem stanice, kondenzacijom kromatina, nastankom apoptotskih tjelešaca i razgradnjom pomoću makrofaga. U apoptozi se citosolni C-terminalni kraj Panx1 reže kaspazom 3 i kaspazom 7. S druge strane, piroptozna je stanična smrt karakterizirana aktivacijom

upalnih kaspaza, bubrenjem stanice i destabilizacijom stanične membrane (20,24). Paneksini su uključeni u piroptozu u kojoj su aktivirane kaspaza 1 i kaspaza 11. Izvanstanični ATP djeluje na P2X7 receptore tako da otvara Panx1 kanale i olakšava ulazak bakterijskih upalnih čimbenika u citosol. Panx1 i Cx43 kolokaliziraju s P2X7 receptorom (13). Panx1 se razgrađuje proteolizom u koju su uključene kaspaze 3 i 7 (25). Osim u staničnoj membrani, paneksini su otkriveni u ER i Golgijevom aparatu (16). Polukanali koneksina otpuštaju ATP i djeluju kao aktivatori upalnog signalnog puta NLP3 (engl. *pyrin domain-containing protein 3*). Izvanstanični ATP stimulira P2X7 receptore, a posljedično smanjenje koncentracije  $K^+$  u citosolu je okidač za aktivaciju NLP3 inflammasoma. P2X7 receptori otpuštaju IL-1 $\beta$  i IL-18 u izvanstanični matriks i potiču upalne posrednike NO, IL-6 i čimbenik nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ). U bolesnika s dijabetičkom nefropatijom povećani izražaj Cx43 u bubrežnoj biopsiji povezan je s aktivacijom P2X7 i NLP3 inflammasoma (26).

Osim što grade GJ, koneksini imaju interakciju s regulatorima proliferacije, rasta i smrti stanice. Cx43 reagira s  $\beta$ -kateninom zbog čega je smanjena količina  $\beta$ -katenina za Wnt signalni put koji je važan za proliferaciju. Ako se humane stanice raka jetre transfektiraju s Cx26, smanji se stanična proliferacija, a to je povezano s povećanim izražajem E-kadherina i stvaranjem staničnog adhezijskog kompleksa. Cx43 u humanim stanicama raka pluća povećava izražaj E-kadherina i zaustavlja stanični ciklus u fazi G1/S. Prekomjerni izražaj N-kadherina i Cx43 u embrionalnim stanicama humanog bubrega suprimira staničnu proliferaciju i odgađa prelazak iz G2 u M fazu. To je popraćeno povećanim izražajem p21Cip1 i padom aktivnosti kinaze 1 ovisne o ciklinu. ZONAB (engl. *ZO-1-associated nucleic acid binding protein*) je transkripcijski čimbenik u promotorskoj regiji gena za regulaciju staničnog rasta. U mozgu štakora pronađena je kolokalizacija ZONAB-a s koneksinima Cx30, Cx32, Cx43 i Cx47. U G0 fazi se ZO-1 veže s Cx43. Interakcija ZO-2-Cx43 utvrđena je u G0 i S fazi u epitelnim stanicama burega štakora. Cx43 stupa u interakciju s NOV (engl. *nephroblastoma overexpressed protein*) u stanicama glioma i koriokarcinoma. NOV kontrolira stanični ciklus jer inhibira proliferaciju. Dlgh1 (engl. *Discs-Large homolog 1*) je tumor-supresorski protein koji na staničnoj membrani hepatocita reagira s Cx32 i blokira prijelaz faze G0/G1. Smanjeni izražaj Cx32 je posljedica prekida interakcije s Dlgh1 koji odlazi u jezgru radi aktivacije proliferacije. Cx26 je povezan sa Bcl-xL i Bax uključenima u apoptozu (27). Kolokalizacija Cx43 s kaspazom 3 u jetri štakora sugerira moguću ulogu koneksina u apoptozu (28). Polukanali koneksina na membrani mitohondrija sudjeluju u staničnom preživljavanju. U stanicama raka gušterače Cx43 na mitohondriju interakcijom s Bax

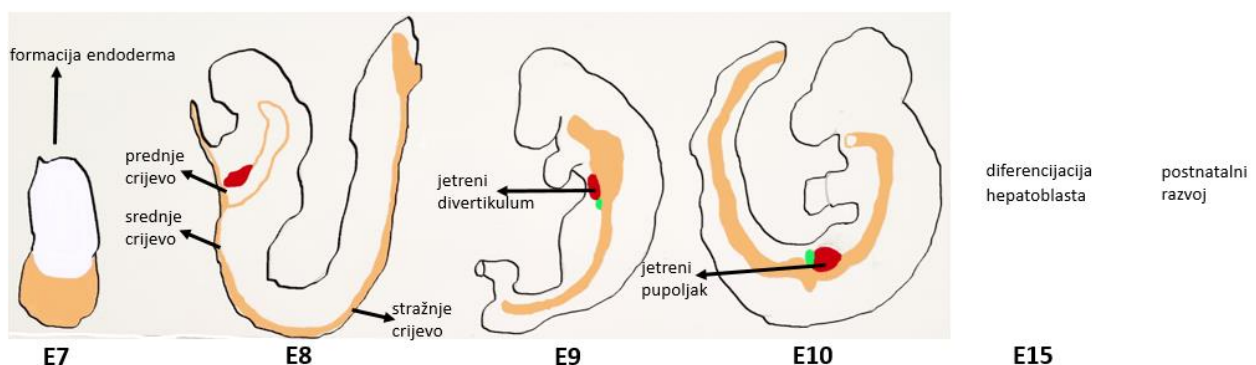
inducira apoptozu. U apoptozi hepatocita posredovanoj Fas signalnim putem smanjuje se GJIC zbog smanjenja Cx32. U isto vrijeme raste koncentracija nosivnog Cx32 koji formira polukanale za koje je pokazano da pospješuju prijelaz apoptoze u nekrozu (13). Naime, kada apoptotične stanice nisu uklonjene, prelaze u upalnu fazu zvanu sekundarna nekroza (29).

U različitim jetrenim bolestima izražaj većine koneksina može biti promijenjen (30). Kolestaza je poremećaj u izlučivanju žuči praćen nakupljanjem štetnih tvari. Kod eksperimentalnog podvezivanja žučnih kanala utvrđen je pad koncentracije Cx32 na mRNA i proteinskoj razini koji je posredovan p38 MAPK-om. Za razliku od drugih koneksina, Cx43 nije pokazao promjene. U akutnim i kroničnim jetrenim bolestima uzrokovanim virusima, alkoholom, drogom i drugim oštećenjima, moguće je umnažanje izvanstaničnog matriksa, fibroza i ciroza. Ključni događaj je transformacija Ito stanica u miofibroblaste. Glodavci tretirani ugljikovim tetrakloridom imali su smanjeni izražaj Cx32 s translokacijom u citoplazmu i jezgru hepatocita i smanjen izražaj Cx26 i Cx43 u Ito stanicama. U aktiviranim Ito stanicama je Cx43 povišen na proteinskoj i mRNA razini te je povećana njegova fosforilacija i GJIC. Izražaj Cx32 smanjen je u hepatitisu. Povećano stvaranje Cx43 utvrđeno je *in vivo* u upali i povezano je s aktivnošću Kupferovih stanica. U ishemiji i reperfuzijskom oštećenju nastaju slobodni radikali kisika. U staničnoj kulturi u primarnim hepatocitima štakora vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) uzrokuje smanjeni izražaj Cx32 i blokadu GJIC. Oksidativni stres i blokada GJIC pomoću  $H_2O_2$  i parakvata dokazani su u primarnim hepatocitima miša (31). Interleukin IL-1b smanjuje razinu Cx32 i GJIC. mRNA Cx26 je povišena nakon izlaganja imortaliziranih hepatocita IL-1, IL-6 i TNF-a. Isto vrijedi za mRNA Cx43 u primarnim Ito stanicama nakon izlaganja LPS-u ili IL-1b (22). U hepatocelularnom karcinomu (HCC) izražaj Cx26 je smanjen zbog DNA hipermetilacije. Cx32 se nakuplja u citoplazmi HCC stanica i povećava njihov metastatski potencijal, a Cx43 se povećava u citoplazmi i staničnoj membrani (32).

Kao testirani i eventualno potencijalni terapeutici predlažu se gliciretinska kiselina i derivati npr. karbenoksolon, dugolančani alkoholi heptanol i oktanol, halogenirani hlapljivi anestetici halotan i enfluran, masne kiseline od kojih neke imaju antagonističku ulogu, fenamati, kvinini i analozi, 2-APB (2-aminoetoksifenil borat), poliamini, ciklodekstrini i metilensko modriko. Predloženi su RNA inhibitori i inhibitori temeljeni na protutijelima koja prepoznaju ekstracelularnu regiju koneksina kao polukanala i inhibitori temeljeni na peptidima (33).

## 1.2. Embrionalni razvoj jetre u miša, građa i funkcija jetre

U miša jetra nastaje iz prednjeg crijeva endoderma koji se oblikuje tijekom gastrulacije (Slika 3) (34,35). Oko embrionalnog dana E6.5-7.5 nastaje endoderm koji se tijekom E7-8.5 podijeli na prednje, srednje i stražnje crijevo. Oko devetog dana formira se jetreni divertikul od čijeg će se prednjeg dijela razviti jetra i intrahepatalni žučni kanalići, a od stražnjeg dijela žučni mjehur i ekstrahepatalni žučni vodovi (35). Hepatoblasti se oko E9.5 odvajaju od epitela i urastaju u poprečnu pregradu mezenhima (septum transversum mezenhim, kratica STM) kako bi oblikovali jetreni pupoljak (36). Jetreni pupoljak brzo raste od desetog do petnaestog dana jer treba preuzeti ulogu glavnog hematopoetskog organa. Oko E13 hepatoblasti se počinju diferencirati i taj se proces nastavlja poslije rođenja. Hepatoblasti u blizini portalnih vena diferenciraju se u epitel žučnih kanalića, a većina hepatoblasta diferencira se u hepatocite na koje otpada 70-80 % zrele jetre (35,37).



Slika 3. Razvoj jetre miša. Endoderm je označen svjetlosmeđom bojom, jetra crvenom, žučni mjehur zelenom. Tijekom gastrulacije (E6.5-7.5) nastaje endoderm koji se tijekom embrionalnih dana E7-8.5 dijeli na prednje, srednje i stražnje crijevo. Oko E9 nastaje jetreni divertikul koji oko E10 izrasta u jetreni pupoljak. Jetra raste i hepatoblasti se diferenciraju u hepatocite i epitel žučnih kanalića. Razvoj jetre nastavlja se i nakon rođenja.

U embrionalnom razvoju endoderma i mezoderma ključnu ulogu imaju s Nodalom povezani ligandi koji pripadaju obitelji transformirajućeg faktora rasta beta (38). Nodal potiče izražaj transkripcijskih čimbenika endoderma kao što su Sox17 i FoxA1-3 (39). U ranom razvoju moguće je identificirati prednje, srednje i stražnje crijevo po transkripcijskim čimbenicima jer Hhex



(engl. *hematopoietically-expressed homeobox*) odgovara prednjem, Pdx1 (engl. *pancreatic duodenum homeobox 1*) srednjem, a Cdx (engl. *caudal homologue*) stražnjem crijevu. Da bi se moglo razviti prednje crijevo, Wnt signalni put mora biti inhibiran (35). Za indukciju jetrenih gena potrebni su koštani morfogenetski proteini (BMP) iz STM i fibroblastični čimbenici rasta (FGF) iz mezoderma (40). Silazno of FGF je MAP kinazni put koji regulira izražaj jetrenih gena, a PI3 kinazni put potiče rast jetre (41). Jetreni geni za albumin, AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) i Hnf4 $\alpha$  (engl. *hepatocyte nuclear factor*) izraženi su već oko E8.5 do E9 (42). Proces delaminacije hepatoblasta jetrenog divertikula od epitela i urastanje u STM da bi se stvorio jetreni pupoljak prate transkripcijski čimbenici Hhex, Gata4, Gata6, Prox 1, Onecut-1 (OC-1) i Onecut-2 (OC-2) (35,43,44). STM i jetreni mezenhim izražavaju čimbenike rasta poput BMP, FGF, TGF  $\beta$ , Wnt, Ra i druge koji promoviraju migraciju i proliferaciju hepatoblasta (35). Za razliku od razvoja endoderma u kojem je Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put inhibiran, od E10  $\beta$ -katenin promovira rast jetre (35,45–48). Hepatoblasti izražavaju gene za hepatocite (albumin, Hnf4 $\alpha$ ), epitel žučnih kanalića (citokeratin 19) i jetrene gene ( $\alpha$ -fetoprotein). Hepatoblasti u blizini portalnih vena povećavaju izražaj citokeratina 19 (CK-19) i smanjuju izražaj jetrenih gena kako bi se diferencirali u epitel žučnih kanalića. Hepatoblasti jetrenog parenhima diferenciraju se u hepatocite (35). Uz HGF i Wnt, diferencijaciju hepatocita promoviraju citokin OSM (Onkostatina M) i glukokortikoidi iz hematopoetskih stanica u jetri (49–52). Diferencijaciju epitela žučnih kanalića potiču TGF  $\beta$ , Wnt, Notch i Wnt/ $\beta$ -katenin signalni putevi. Hepatoblasti povećavaju izražaj transkripcijskih čimbenika epitela žučnih kanalića, OC1/HNF6, OC2 i HNF1 $\beta$  (35). Iako žučni mjehur i ekstrahepatalni žučni putevi imaju drugo podrijetlo, za razvoj su im potrebni zajednički čimbenici poput HNF6, Hhex i Hex1. S druge strane, transkripcijski čimbenik Foxf1 potiče razvoj samo žučnog mjehura i ekstrahepatičnih žučnih kanala (35,53). Stanice strome, Kupferove stanice, Ito stanice i krvne žile potječu od embrionalnog mezoderma (35,54).

Jetra igra važnu ulogu u metabolizmu: regulira glikemiju, sudjeluje u sintezi ureje, lipida, ketonskih tijela, sintezi i razgradnji proteina plazme, stvaranju i izlučivanju žuči. Imunološka uloga očituje se kroz detoksifikaciju i razgradnju ROSa (engl. *reactive oxygen species*). Jetra sudjeluje u sintezi i otpuštanju hormona i uz njih vezanih proteina, igra važnu hematopoetsku ulogu u fetalno vrijeme, skladište je krvi, regulira pH krvi i sudjeluje u sintezi i razgradnji komponenata izvanstaničnog matriksa (2). U zreloj jetri portalnu trijadu sačinjavaju žučni kanalić, ogranak jetrene arterije i portalne vene, a nalaze se još limfne žile i živci. Acinusi su osnovna funkcionalna jedinica jetre, građeni su od hepatocita zrakasto poredanih u dvoredne

ploče odvojene sinusoidama. U sinusoidama se ulijeva miješana krv iz portalne vene i hepatalne arterije i u središtu acinusa ulijeva u centralnu venu od koje nastaje hepatalna vena (2). Krvna plazma oplakuje hepatocite što omogućava izmjenu metabolita i toksina. Hepatociti izlučuju žuč koja se preko žučnih kapilara i žučnih kanalića prenosi do ekstrahepatičnih žučnih vodova i u žučni mjehur (35).

Hepatocit je poligonalna epitelna stanica s centralno smještenom jezgrom u kojoj su jedna do dvije jezgrice. Hepatociti mogu biti diploidni i poliploidni. Citoplazma je eozinofilna zbog hrapave endoplazmatske mrežice i zrnata zbog glikogena. U sinusoidama su endotelne i Kupferove stanice poduprte retikulinskim vlaknima. Nepotpuna bazalna membrana endotela olakšava izmjenu tvari između krvi i hepatocita (55–58). Kupferove stanice pripadaju fagocitnom sustavu. Između endotela i hepatocita je Disseov prostor, mjesto međustanične izmjene tvari koje sadrži plazmu, vezivo i lipocite tzv. Ito stanice i NK stanice. Vezivo duž sinusoida je građeno od kolagena tipa III, IV i laminina. Lipociti su skladišta masti i vitamina A, a preformirani u miofibroblaste sintetiziraju kolagen. Ekstracelularni matriks u portalnim prostorima građen je od kolagena tipa I. Kolagen IV i V i laminin nalaze se u bazalnoj membrani krvnih žila i žučnih kanala (55).

Jedna od osnovnih funkcija jetre je proizvodnja žuči koja sadrži žučne kiseline, kolesterol, elektrolite i žučni pigment. Hepatociti izlučuju žuč u žučne kanaliće koji su povezani s ekstrahepatičnim žučnim vodovima. Preko cističnog voda žuč dolazi do žučnog mjehura i tijekom obroka vraća u žučovod i otpušta u dvanaesnik. Dva hepatalna kanala, cistični kanal i žučovod pripadaju ekstrahepatičkim žučnim kanalima. Obloženi su kolangiocitima. Nastaju oko E13.5-14.5 iz hepatoblasta u blizini portalnog mezenhima. Oko E15.5 preteče epitela žučnih kanalića tvore jednoslojni prsten oko portalnog mezenhima, odnosno duktalnu ploču, zatim se razvije drugi sloj te proširenja između njih i tako nastaju kanali. Prije rođenja, žučni kanali su potpuno inkorporirani u mezenhim portalnih prostora (37).

80 % krvi bogate hranjivim tvarima jetra prima iz portalne vene, a 20 % krvi bogate kisikom iz hepatalne arterije. Portalna vena se grana na interlobularne vene, raspodjelne venule i ulazne venule koje ulaze u sinusoida. Sinusoida zrakasto teku prema centralnoj veni koja se postupno proširuje primajući sve više i više sinusoida. Na bazi režnjića centralne vene se ulijevaju u prijelazne sublobularne vene koje se spajaju u dvije ili više hepatalnih vena i ulijevaju u donju šuplju venu. Glavna uloga portalnog sustava je prijenos krvi bogate hranjivim tvarima

apsorbiranim u tankom crijevu, te krvi iz slezene i gušterače. Hepatalna arterija prenosi do hepatocita krv bogatu kisikom. Hepatalna arterija se grana na interlobularne arterije od kojih neke opskrbljuju portalne prostore, a druge se granaju u arteriole koje ulaze u sinusoide gdje se miješa arterijska i portalna venska krv. Krv, hranjive tvari i toksične tvari teku od periferije prema središtu režnjića pa se svojstva perilobularnih hepatocita razlikuju od hepatocita u središtu režnjića, što je posebno važno u patologiji jetre (59).

### 1.3. Reelin signalni put i *Dab1* *-/-* (*yotari*) miševi

Reelin je izvanstanični glikoprotein koji regulira migraciju neurona i stvaranje staničnog sloja tijekom razvoja mozga (60,61). U embrionalno vrijeme Cajal-Retziusove stanice izražavaju reelin. Te stanice umiru u neokorteksu neposredno nakon rođenja i ne mogu se naći nakon završetka migracije neurona (63). U ranom postnatalnom razdoblju u hipokampusu Cajal-Retziusove stanice i dalje izražavaju reelin, što pridonosi grananju i razvoju aksona i dendrita (60). Postnatalno ga izlučuju GABA-ergični interneuroni i time utječu na sinaptičku aktivnost i plastičnost. *RELN* (reelin gen) se prepisuje u jezgri, prevodi u protein na hrapavoj ER i posttranslacijski oblikuje u Golgijevom aparatu (62). Izlučeni reelin cijepaju metaloproteinaze na N i C terminalne fragmente (Nt i Ct) i centralni fragment (C) koji je važan za prijenos signala. Češće se nalazi potpuni slijed proteina nego centralni fragment jer N terminalna regija potiče agregaciju, a C terminalna regija pravilno oblikovanje proteina (engl. *foldin*) (60,63). U miša je molekularna masa reelina 385 kDa i ima 95.2%-tnu sličnost s humanim proteinom (64). Građa proteina temelji se na osam ponavljajućih sekvenci smještenih oko epidermalnog čimbenika rasta (EGF, engl. *epidermal growth factor*) (60).

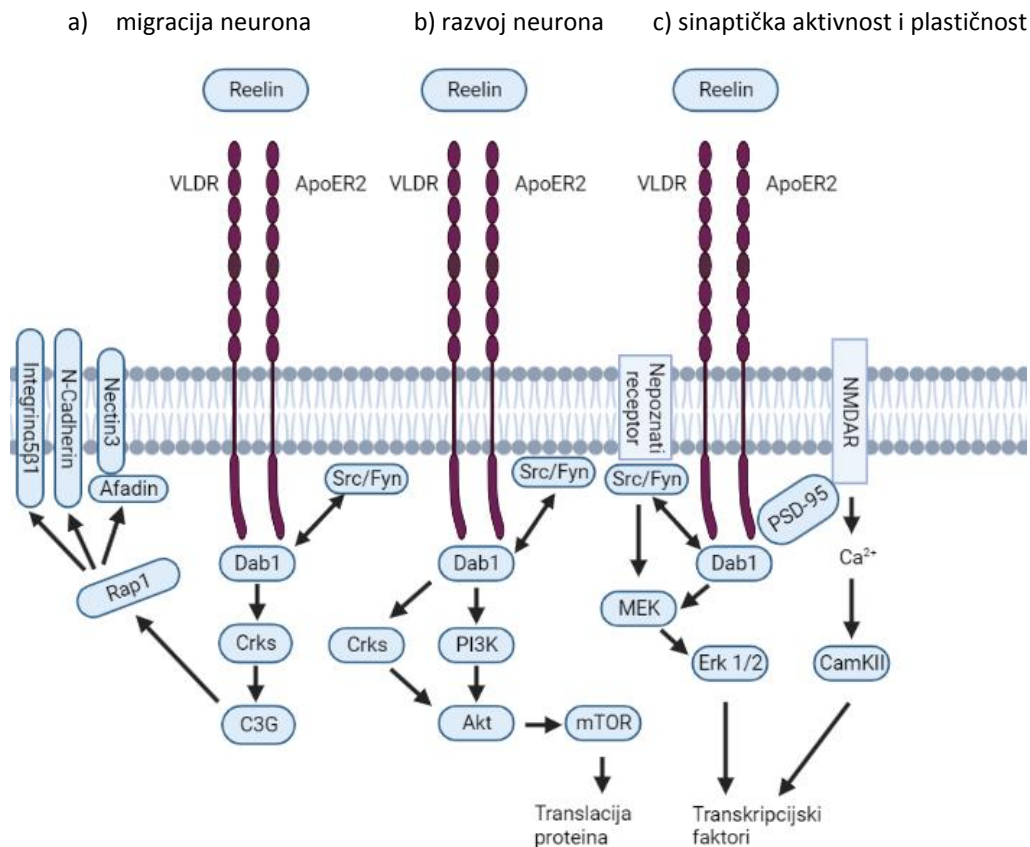
Glavni receptori reelina su iz obitelji lipoproteinskih receptora niske gustoće: apolipoprotein E receptor 2 (ApoER2) i lipoproteinski receptor jako niske gustoće (VLDLR od engl. *very low-density lipoprotein receptor*). Dvostruki *knock-out* tih receptora u miša izražava isti fenotip kao *reeler* (*RELN* *-/-* miš). C fragment reelina je bitan za interakciju ApoER2/VLDLR, prijenos signala i oblikovanje kortikalnog moždanog sloja. Unatoč funkcionalnom preklapanju, navedeni receptori igraju različite uloge u migraciji neurona. VLDLR je izražen u apikalnim procesima migracije na vrhu kortikalne ploče i posreduje u somalnoj ili terminalnoj translokaciji tijekom

razvoja neurokortexa. ApoER2 je izražen u međuzoni i važan je u tranziciji multipolarne na bipolarnu morfologiju i ranu fazu radijalne migracije (60,63,65).

*Reeler* mutant miševi (*RELN* *-/-*) klinički pokazuju ataksiju, tremor, poremećaj motoričke koordinacije i nepravilan hod. Imaju hipoplaziju malog mozga jer Purkinjeove stanice nisu oblikovale stanični sloj, te druge neurološke abnormalnosti jer radijalni neuroni nisu dospjeli na ispravne pozicije tijekom razvoja mozga (64,66,67). Prenatalno je reelin odgovoran za migraciju neurona, a postnatalno potiče razvoj dendrita i sinaptičku plastičnost. Heterozigotni *reeler* miš smatran je mehaničkim modelom za proučavanje sniženja regulacije *RELN* u shizofreniji ili lateralnoj temporalnoj epilepsiji (60,68,69). Reelin je rizični čimbenik za autizam i potencijalno druge neurološke poremećaje (70–73). U miševa starih dva mjeseca inaktivacija *RELN* ne utječe na strukturu velikog i malog mozga, što još više ističe njegovu važnost tijekom embrionalnog razvoja (74). Od drugih transmembranskih proteina,  $\beta 1$  integrini su bili predloženi kao potencijalni receptori, ali vjerojatno sudjeluju u kortikogenezi kao nizvodni čimbenici pa VLDLR i ApoEr2 ostaju najvažniji receptori za reelin (60).

Intracelularni adaptor za reelin signalni put je Dab1 (engl. *Disabled-1*) koji se veže na citoplazmatski kraj ApoER1 i VLDLR (60,75). Za NPPXY citoplazmatsku domenu tih lipoproteinskih receptora veže se PTB (engl. *phosphotyrosine binding*) domena Dab1 (76). Nakon vezanja reelina na receptore, Fyn i Src kinaze forsoriliraju Dab1 što je ključno za migraciju neurona. Fosfo-mutant Dab1 miševi, Fyn/Src *knock out* miševi i Dab1 *knock out* miševi imaju fenotip sličan *reeler* (*RELN* *-/-*) miševima (76–82). Nakon prijenosa signala, fosfoDab1 bude podvrgnut ubikvitinaciji pomoću Cullin 5 E3 ubikvitin ligaze i razgrađen u proteasomu (60,83). Nizvodno od tog kanonskog puta, različiti signalni putovi reguliraju specifične biološke aktivnosti u razvoju mozga. Prenatalno, reelin preko Crk/C3G/Rap1 signalnog puta (protoonkogen C/čimbenik zamjene gvanin nukleotida/protein 1 vezan na RAS) kontrolira migraciju neurona i stvaranje kortikalnog sloja. Rezultat je regulacija funkcije adhezijskih molekula nektina 3, N-kadherina i integrina  $\alpha 5\beta 1$ , što olakšava somalnu translokaciju i stvaranje kortikalnog sloja. Tijekom ranog postnatalnog razvoja Crk adaptorski proteini idu preko PI3K-Akt-mTOR (fosfatidil inozitol 3-kinaza-Ser/Thr kinaza B– sisavačka meta za rapamicin) i potiču translaciju proteina važnih za razvoj dendrita i kralježnice. U kasnom postanatalnom razvoju i odrasloj dobi, ApoER2 u interakciji s NMDAR (N-metil-D-aspartat) receptorom preko PSD-95 (protein postsinaptičke gustoće 95) utiče na priljev  $Ca^{2+}$  i aktivaciju kalcij kalmodulin ovisne

kinaze (kratica CamII). Signalni put može ići preko nepoznatog receptora koji aktivira signalni put MEK-Erk1/2 (mitogenom aktivirana kinaza/ekstracelularnim signalima aktivirana kinaza1/2) pomoću Src/Fyn kinaza. Oba signalna puta potiču transkripciju neposrednih ranih gena uključenih u učenje i pamćenje, te utječu na sinaptičku aktivnost i plastičnost (60) (Slika 4).



Slika 4. Reelin signalni putovi. Ekstracelularni reelin se veže na receptore ApoER2 i VLDR koji aktiviraju Src/Fyn kinaze, a one fosforiliraju intracelularni Dab1. a) Prenatalno reelin kontrolira migraciju neurona i stvaranje kortikalnog sloja preko Crk/C3G/Rap1 signalnog puta. Taj put regulira funkciju adhezijskih molekula nectina 3, N-kadherina i integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 koji olakšavaju somalnu translokaciju i stvaranje staničnog sloja. b) Tijekom ranog postnatalnog razvoja Crk adaptorski proteini i PI3K/Akt/mTOR signalni put potiču translaciju proteina i razvoj dendrita. c) U kasnijem postnatalnom razvoju i odrasloj dobi reelin je važan u funkciji sinapsa i plastičnosti mozga. Signalni put dijelom ide preko receptora ApoER2 koji reagira s NMDR preko PSD-95 i uzrokuje priljev Ca<sup>2+</sup> i aktivaciju CamKII. Drugi način je od nepoznatog receptora koji aktivira MEK/ERK 1/2 signalni put preko Src/Fyn kinaza. Navedeni putovi potiču sinaptičku aktivnost i

plastičnost indukcijom neposrednih ranih gena uključenih u učenje i pamćenje. Za izradu slike korišten je Biorender program.

Autosomalno recesivni mutanti *Dab1* miševi (*yotari* i *scrambler*) imaju sličan fenotip kao *reeler* miševi (76,79,84) i miševi s mutacijama ApoER2 i VLDLR (75). U svih se nalazi nepravilna kortikalna laminacija, smanjeni mali mozak s nedostatkom folijacije i ektopija neurona (79). Mali mozak homozigotnih *yotari* miševa je hipoplastičan i bez folijacije. Molekularni i granularni stanični sloj se mogu razlikovati, a Purkinjeove stanice su razbacane po bijeloj tvari i granularnom sloju. Narušena je laminarna struktura kore i oblikovanje hipokampusa (81). *Yotari* miševi imaju sinaptičke malformacije i kognitivna oštećenja hipokampusa. Do 10. postnatalnog dana *yotari* miševi imaju normalno ponašanje, a od 15. dana manifestiraju ataksiju, tremor, nepravilan hod i često se prevrću na leđa (79). Drhtanje, nestabilan hod i smrt između 20. i 30. postnatalnog dana su glavne karakteristike *yotari* miša. Njihov vrlo kratki životni vijek otežava šire znanstveno proučavanje (86).

Dosadašnja istraživanja reelina bila su vezana ponajviše za razvoj živčanog sustava i ulogu u neurološkim nepravilnostima. U novije vrijeme analizira se uloga reelina u drugim tkivima i organima pa je tako potvrđen izražaj reelina u slezeni, bubrezima, jetri, testisima, intersticiju jajnika, srži nadbubrežne žlijezde, zreloj jetri, hipofizi, prisutnost u humanoj plazmi, te plazmi štakora i miševa (64,85–87). Uloga reelin signalnog puta istražena je u razvoju odontoblasta, mliječnih žlijezda, limfnih putova, tankog crijeva, slinovnice, kosti i hrskavice (85,88–95). Reelin ima ulogu u fibrozi jetre i reumatoidnom artritisu, karcinomu i drugim bolestima (96–103).

U jetri je reelin izražen u Ito stanicama, a manje u hepatocitima (85,99,103–105). Jetra *reeler* miševa ne pokazuje morfološke nepravilnosti. Izražaj reelina je veći u aktivnim Ito stanicama miša nego neaktivnima, te u štakora s fibrozom u usporedbi s kontrolnom skupinom (85,87,99,106). Razina reelina u hepatocitima ne mijenja se u odgovoru na oštećenje ako je proliferacija hepatocita bila blokirana delecijom DDB1 (engl. *damage specific DNA-binding protein 1*). Proliferirajuće ovalne stanice su više izražavale reelin nego ovalne stanice jetre u miševa podvrgnutih kemijski izazvanoj ozljedi (107). U bolesnika s cirozom je veća razina reelina nego u zdravoj kontroli (99). U bolesnika zaraženih virusom hepatitisa C reelin je biljeg za progresiju fibroze jetre (103). Budući da reelin izražavaju Ito stanice/miofibroblasti, broj im se značajno povećava s napretkom fibroze jetre (108). *Dab1* je izražen u duktularnom epitelu, a

reelin posrednik u aktivaciji duktularnih stanica od strane lto stanica (85). Izražaj Dab1 dokazan je u fetalnom bubregu (109), a koneksini predloženi kao potencijalni pokazatelji narušene funkcije bubrega (110), što je dokazano na *yotari* miševima (111).

## 2. CILJEVI I HIPOTEZA



## 2.1. Ciljevi istraživanja

Primjenom imunofluorescencije analizirati izražaj koneksina (Cxs), paneksina 1 (Panx1), inducirajućeg čimbenika apoptoze (AIF) i kaspaze 3 (cas3) u embrionalnoj jetri *yotari* i kontrolnih *wild type* (wt) miševa u razvojnom dobu E13.5 i E15.5, te istražiti potencijalni reelin signalni put u embrionalnoj jetri.

Specifični ciljevi istraživanja:

- 1) Analizirati i usporediti izražaj koneksina Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 u embrionalnoj jetri *yotari* i wt miševa
- 2) Analizirati i usporediti izražaj paneksina 1, inducirajućeg čimbenika apoptoze i kaspaze 3 u embrionalnoj jetri *yotari* i wt miševa
- 3) Usporediti izražaj navedenih koneksina, paneksina, inducirajućeg čimbenika apoptoze i kaspaze 3 u embrionalnoj jetri wt miševa između dva razvojna doba, E13.5 i E15.5
- 4) Usporediti izražaj navedenih koneksina, paneksina, inducirajućeg čimbenika apoptoze i kaspaze 3 u embrionalnoj jetri *yotari* miševa između dva razvojna doba, E13.5 i E15.5
- 5) Ispitati potencijalni reelin signalni put u embrionalnoj jetri wt i *yotari* miševa analizom izražaja reelina, ERK, mTOR i p38
- 6) Ispitati i usporediti izražaj potencijalnih upalnih čimbenika TGF  $\beta$ 1 i  $\alpha$ -SMA u embrionalnoj jetri *yotari* miševa i wt miševa
- 7) Ispitati moguću kolokalizaciju Cx43 i kaspaze 3
- 8) Usporediti histološku građu embrionalne jetre *yotari* i wt miševa u dva razvojna doba, E13.5 i E15.5

## 2.2. Hipoteza istraživanja

Genski izražaj koneksina je promijenjen u embrionalnoj jetri *yotari* miševa i upućuje na poremećaj stanične komunikacije važne za razvoj i funkciju jetre.

### 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Etička dozvola

Doktorska disertacija izrađena je u sklopu HRZZ projekta voditeljice prof. dr. sc. Katarine Vukojević, dr. med. u suradnji s Mediteranskim Institutom za istraživanje života (MedILS) i Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan. Naziv HRZZ projekta glasi: „Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta tijekom razvoja u miša i čovjeka“. Sukladno odredbi članka 16. Etičkog kodeksa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu Povjerenstvo je jednoglasno iznijelo stav da je predmetno istraživanje u skladu s odredbama Etičkog kodeksa koje reguliraju istraživanja na ljudima i životinjama u znanstvenom, istraživačkom i stručnom radu i etičkim načelima Helsinške deklaracije.

Klasa: 003-08/16-03/0001

Ur.br.:2181-198-03-04-16-0024

### 3.2. Animalni uzorci

*Dab1* homozigotne životinje dobivene su križanjem heterozigota od strane kompanije Jackson Laboratories. C57BL/6N miševi uzgajani su u temperaturno kontroliranim uvjetima ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), u standardnim polikarbonatnim kavezima uz izmjenu 12h dan/noć ciklusa i s neograničenim pristupom vodi i hrani. U svakom kavezu bili su prisutni divlji tip (wt/wt) miša, heterozigot (wt/yot) te homozigot *Dab1* knock out (yot/yot). Quigen kit korišten je za izolaciju DNA iz repova životinja. Početnice korištene za genotipiziranje PCR analizom su:

divlji tip: GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CCTTGTTTCTTTGCTTTAAGGCTGT

*yotari*: GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CAGTGAGTACATATTGTGTGAGTTCC.

Embrionalnog dana 13.5 (E13.5) i 15.5 (E15.5) miševi su anestezirani i transkardijalno perfundirani PBS-om i 4% paraformaldehidom u 0.1 M PBSa. Embriji su izdvojeni i fiksirani preko noći pomoću 4% PFA u 0.1 M PBS.

### 3.3. Imunofluorescencija

Nakon fiksacije uzorci su isprani PBS-om i dehidrirani u gradijentu etanolu (25%, 50%, 75%, 90%, 100%), izbistreni u ksilenu, parafinirani i uklopljeni u parafinske blokove. Rezovi debljine 5  $\mu\text{m}$  izrezani na mikrotomu montirani su na predmetnice. Prije standardnog HE i imunofluorescentnog bojenja, deparafinirani su u ksilenu, rehidrirani u silaznom gradijentu etanola (100%, 90%, 75%, 25%) i isprani u vodi.

### 3.4. Hematoksilin-eozin bojanje

Hematoksilin-eozin bojanje (HE) omogućuje jasno razlikovanje tkivnih struktura u histološkom preparatu. Hematoksilin plavo boji jezgru i kisele komponente, a eozin ružičasto boji citoplazmu, mišićna vlakna, vezivno tkivo i eritrocite. Svako deseti rez dobiven mikrotomom obojen je HE metodom za provjeru očuvanosti i preglednosti uzoraka za ciljana istraživanja. Nakon deparafinizacije i rehidracije uzorci su inkubirani 15 minuta u Meyerovoj otopini hematoksilina nakon čega su isprani u mlakoj alkalnoj vodovodnoj vodi i inkubirani 5 minuta u otopini eozina. Nakon dehidracije i bistrenja, apliciran je medij za uklapanje Canada balzam i preparat pokriven pokrovnicom. Uspješnost pripreme uzoraka za daljnje pokuse provjerena je svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

### 3.5. Imunofluorescencijsko bojanje

U svrhu otkrivanja epitopa, nakon deparafinizacije i rehidracije, preparati su kuhani u citratnom puferu (pH 6), 20 minuta na 95 °C, ohlađeni na sobnoj temperaturi i isprani PBS-om. Budući da se na jednom predmetnom stakalcu nalazilo više različitih embrija istog genotipa, međusobno su odvojeni PAP Pen-om. Kako bi izbjegli nespecifična vezanja, uzorci su inkubirani u puferu za blokiranje proteina (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga nanesena su primarna protutijela razrijeđena s radnom otopinom PBS (Tablica 1). Preparati su inkubirani preko noći u tamnoj vlažnoj komori kako bi se primarna antitijela što bolje vezala za ciljne antigene. Sljedeći dan uzorci su isprani s PBS-om i inkubirani s odgovarajućim sekundarnim protutijelima 1 sat na sobnoj temperaturi, u tamnoj vlažnoj

komori. Potom su preparati isprani PBS-om i apliciran je DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol) 1 minutu na sobnoj temperaturi, za obojenje jezgara. Uzorci su potom isprani PBS-om i destiliranom vodom, uklopljeni u medij (Immuno-Mount, Thermo Shandon) i pokriveni pokrovnicom.

### 3.6. Svjetlosna fluorescencijska mikroskopija

Za analiziranje preparata korišten je svjetlosni i fluorescencijski mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan) koji je opremljen digitalnom kamerom Nikon DP71 (Olympus, Tokyo, Japan). Za fluorescencijsku mikroskopiju korištena su tri različita fluorescencijska kanala. U svakom preparatu analizirano je 15 reprezentativnih vidnih polja najvećeg povećanja (1000x, imerzijsko ulje) i slikani su s istim postavkama kamere.

### 3.7. Obrada i analiza dobivenih podataka

Za evaluaciju, obradu i prikupljanje podataka korišteni su računalni programi ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) i Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, California, USA). Naredbe „*split channels*“ i „*image calculator*“ u ImageJ programu korištene su za uklanjanje nespecifičnog bojanja. Fotografije su preklapane u Adobe Photoshop programu i izračunat je postotak površine vidnog polja prekriven pozitivnim signalom. Obradu fotografija i računanje postotka površine prekrivenog pozitivnim signalom radila su neovisno tri istraživača. Autofluorescencijsko bojanje primjerice eritrocita isključeno je prilikom obrade fotografija kako bi se izbjegao lažno pozitivni signal.

### 3.8. Statistička obrada podataka

Statistička analiza je provedena korištenjem GraphPad Software 8.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistička značajnost određena je vrijednošću  $P < 0.05$  i intervalom pouzdanosti (CI) od 95%. One-way ANOVA test uz Tukey's test korišten je za usporedbu imunoizražaja

između ispitivanih skupina. Četiri uzorka po svakoj od skupina (wt E13.5, wt E15.5, yot E13.5, yot E15.5) analizirani su za svako protutijelo.

Tablica 1. Primarna i sekundarna protutijela upotrijebljena u istraživanju

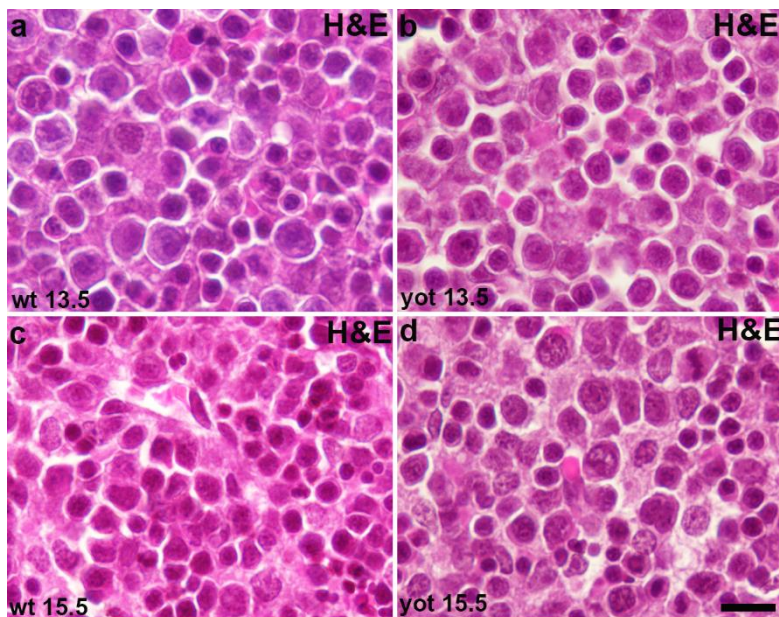
	Protutijela	Kataloški broj	Domaćin	Razrijeđenje	Izvor
Primarna	Cx26, GJB2	CSB-PA009452L A01HU	Zec	1:50	Cusabio (Wuhan, Kina)
	Cx32, GJB1	CSB-PA008853	Zec	1:100	Cusabio (Wuhan, Kina)
	Anti-Cx37/GJA4	ab181701	Zec	1:300	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-Cx40/GJA5	ab213688	Zec	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-Cx43/GJA1	ab87645	Koza	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-Cx45/GJA7	ab135474	Zec	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-pannexin1/PANX1	ABN242	Zec	1:150	MerckKGaA (Darmstadt, Njemačka)
	Human/Mouse/Rat AIF	AF5824	Ovca	1:300	R&DSystems (Minneapolis, MN, SAD)
	Recombinant Anti-Caspase-3 Antibody E87	ab32351	Zec	1:50	Abcam (Cambridge, UK)
	Anti-reelin E-5	sc-25346	Miš	1:50	Santa Cruz Bt. (Texas, TX, SAD)
	P44/42 MAPK (Erk ½) 137F5	4695	Zec	1:250	Cell Signaling Techn. (Danvers, MA, SAD)
	mTOR Polyclonal	PA5-34663	Zec	1:100	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, SAD)
	p38 MAPK Antibody	9212	Zec	1:100	Cell Signaling Techn. (Danvers, MA, SAD)
	Recombinant Anti-TGF beta1 EPR21143	ab215715	Zec	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
	Smooth muscle actin 1A4	M0851	Miš	1:200	Dako (Njemačka)
Sekundarna	Donkey Anti-Goat IgG Alexa Fluor 488	ab150129	Magarac	1:400	Abcam (Cambridge, UK)
	Donkey Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488	ab150073	Magarac	1:400	Abcam (Cambridge, UK)
	Rhodamine (TRITC) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	711-025-152	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, SAD)
	Rhodamine Red-X AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG	713-295-003	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, SAD)
	Anti-mouse IgG Rhodamine Red	715-295-151	Magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., (Baltimore, PA, SAD)

## 4. REZULTATI

U embrionalnoj jetri wt i *yotari* (*Dab1*  $-/-$ ) miševa ispitana je stanična komunikacija preko GJ u embrionalnim danima, E13.5 i E15.5. Analiziran je imunoizražaj koneksina Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45. Stvaranje polukanala i sklonost apoptozi ispitani su analizom imunoizražaja Panx1, AIF i cas3. Morfološke razlike embrionalne jetre wt i *yotari* miševa analizirane su histološki na HE preparatima u E13.5 i E15.5. Potencijalni reelin signalni put u embrionalnoj jetri istražen je analizom izražaja reelina, ERK, mTOR i p38. Analiziran je i uspoređen izražaj potencijalnih upalnih biljega TGF  $\beta$ 1 i alfa SMA u embrionalnoj jetri wt i *yotari* miševa u E13.5 i E15.5.

#### 4.1. Morfološka građa jetre *wild type* i *yotari* miša

Na preparatima obojenim HE metodom svjetlosno mikroskopski je analizirana građa jetre u wt i *yotari* miševa tijekom ranog (E13.5) i kasnijeg (E15.5) razvoja jetre. Nisu uočene nepravilnosti embrionalne jetrene građe *yotari* miševa u odnosu na wt miševe (Slika 5).

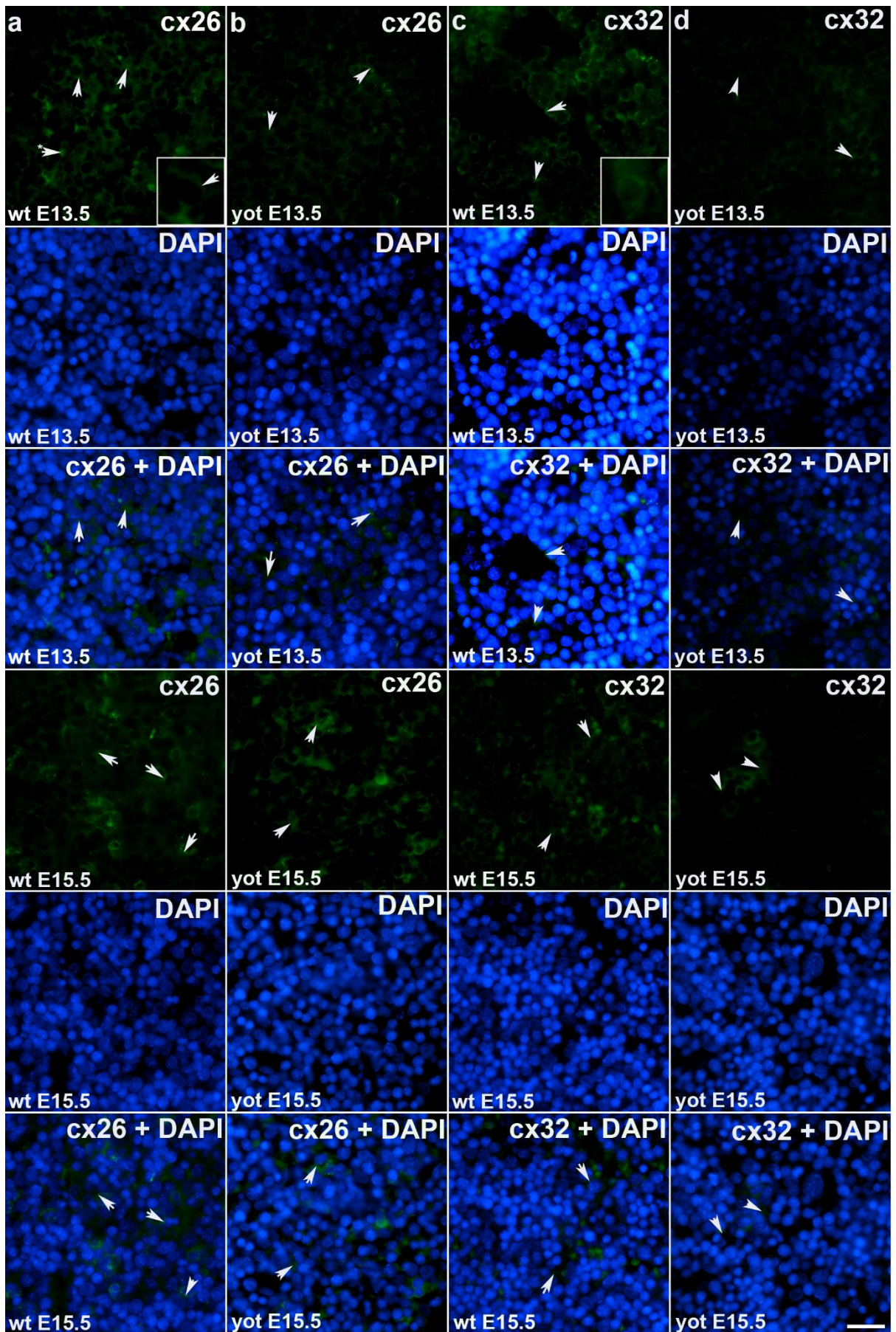


Slika 5. Hematoksilin-eozin bojanje embrionalne jetre wt i *yotari* miševa. wt (a) i yot (b) jetra embrionalnog dana 13.5 (E13.5). wt (c) i yot (d) jetra embrionalnog dana 15.5 (E15.5). Mjerna trakica iznosi 8  $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.



## 4.2. Izražaj koneksina u embrionalnoj jetri wt i *yotari* miša

U kontrolnoj skupini wt miševa tijekom E13.5 u jetri su izraženi svi ispitivani koneksini (Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45). U E15.5 utvrđen je manji izražaj tih koneksina, s izuzetkom Cx45 koji je bio jače izražen u kasnijoj fazi razvoja. Cx26 je jednako izražen u E13.5 i E15.5, za razliku od *yotari* miševa u kojih je uočen značajno manji izražaj (Slika 6 a, b i Slika 10). Izražaj Cx32 je smanjen u wt miševa gestacijske starosti E15.5 u usporedbi s E13.5. U *yotari* miševa je izražaj Cx32 značajno smanjen u obje razvojne faze u odnosu na wt miševe. Najniži izražaj uočen je u embrionalnoj jetri *yotari* miševa starosti E15.5 (Slika 6 c, d i Slika 10).

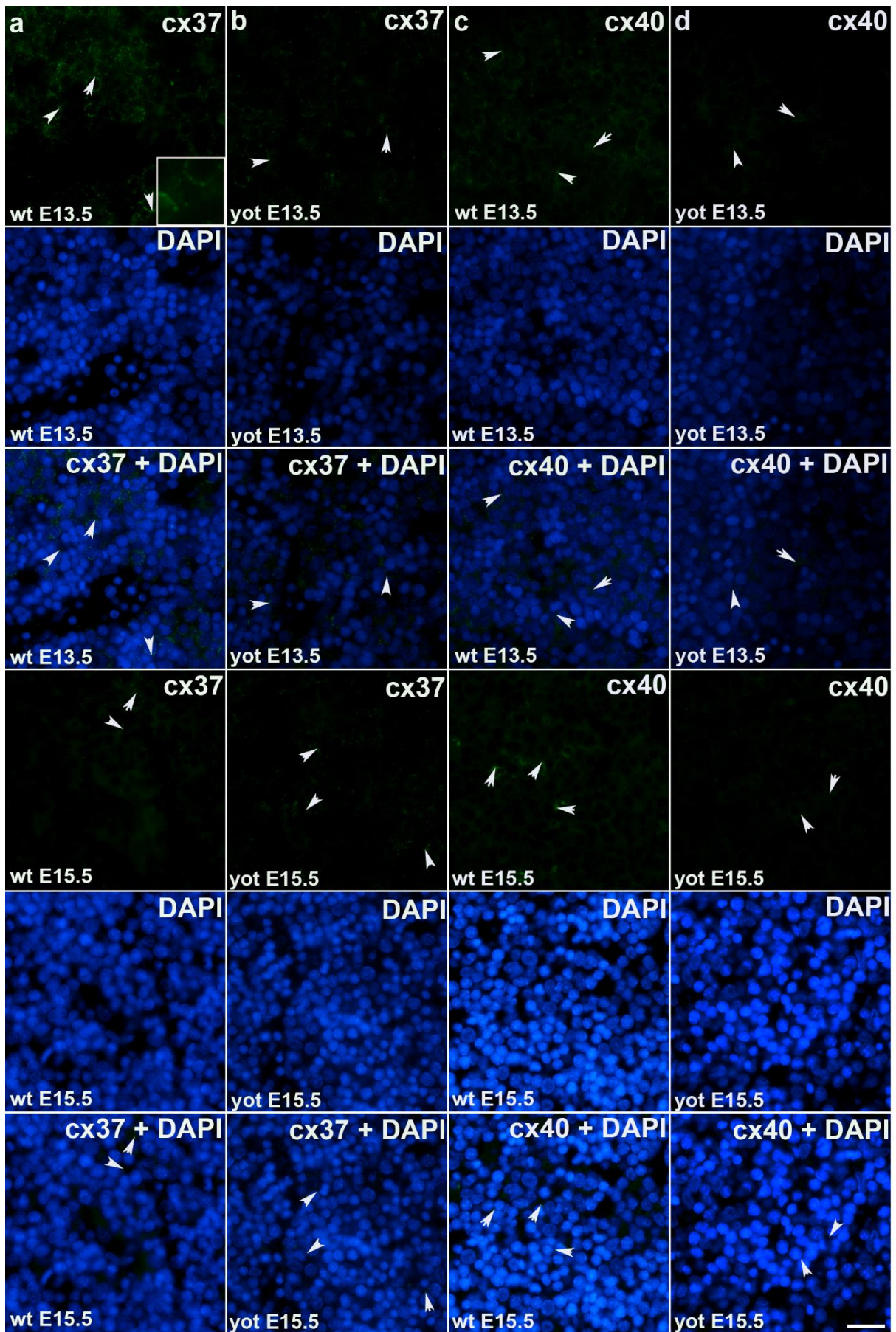


Slika 6. Imunofluorescencijsko bojanje koneksina (Cxs): Cx26 i Cx32 u jetri wt i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Imunoizražaj Cx26, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklopljena mikrofotografija Cx26 i DAPI u E13.5 i E15.5 u wt (a) i *yotari* jetri (b). Imunoizražaj Cx32, DAPI bojanje i preklopljene mikrofotografije Cx32 i DAPI u E13.5 i E15.5 wt (c) i *yotari* (d) jetri. \* Autofluorescencija eritrocita ne smije biti pomiješana s pozitivnim signalom izražaja proteina. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.

Utvrđen je jaki izražaj Cx37 u wt miševa E13.5, ujedno najjači od svih ispitanih koneksina. *Yotari* miševi su embrionalnog dana E13.5 imali pet puta slabiji izražaj Cx37. U E15.5 wt miševi imali su vrlo slabi izražaj Cx37, a u *yotari* miševa je izražaj bio pozitivan, iako slabiji nego u E13.5 (Slika 7 a, b i Slika 10).

U E13.5 *yotari* miševa je izražaj Cx40 bio značajno slabiji nego u wt miševa, dok je u E15.5 izražaj Cx40 vrlo slab (Slika 7 c, d i Slika 10).



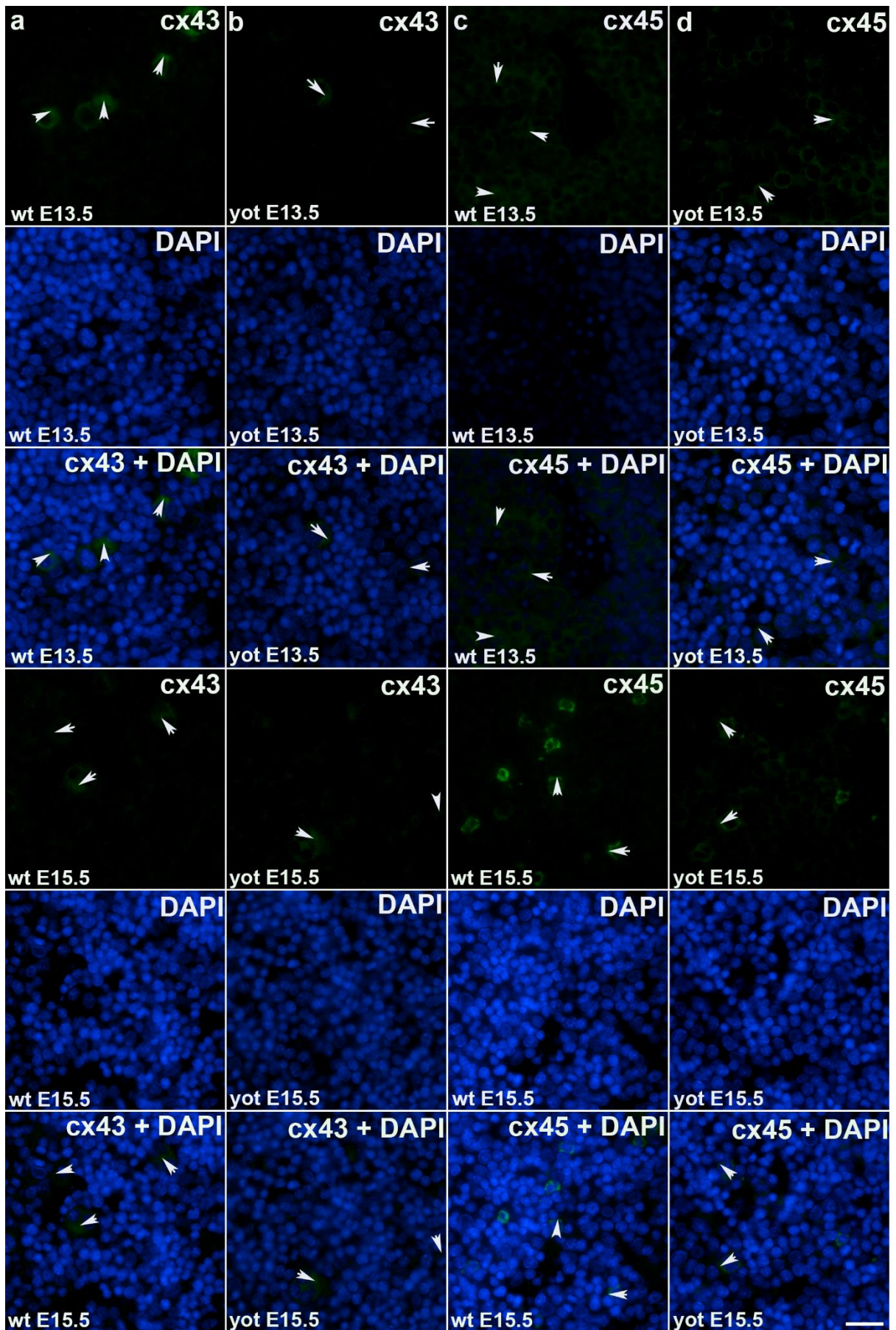


Slika 7. Imunofluorescencijsko bojanje koneksina Cx37 i Cx40 u jetri wt i *yotari* miševa embrionalnog dana E13.5 i E15.5. Imunoizražaj Cx37, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklopljena mikrofotografija Cx37 i DAPI u E13.5 i E15.5 *wild type* (a) i *yotari* jetri (b). Imunoizražaj Cx40, DAPI bojanje i preklopljene mikrofotografije Cx40 i DAPI u E13.5 i E15.5 wt (c) i *yotari* (d) jetri. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.

Cx43 je imao niski izražaj u embrionalnoj jetri u obje ispitivane skupine u E13.5 i E15.5. Najviši izražaj imali su wt miševi u E13.5, dok su *yotari* iste dobi imali značajno manji izražaj. Kod E15.5 nije nađena značajna razlika u izražaju Cx43 između wt i *yotari* miševa. U *yotari* miševa utvrđeno je blago povećanje izražaja Cx43 u E15.5 u odnosu na E13.5 (Slika 8 a, b i Slika 10).

Cx45 je značajno slabije izražen u *yotari* miševa nego u wt miševa u obje promatrane razvojne faze. U wt miševa je značajno, 2.6 puta veći izražaj u E15.5 nego u E13.5, dok u *yotari* miševa nije pronađena značajna razlika (Slika 8 c, d i Slika 10).





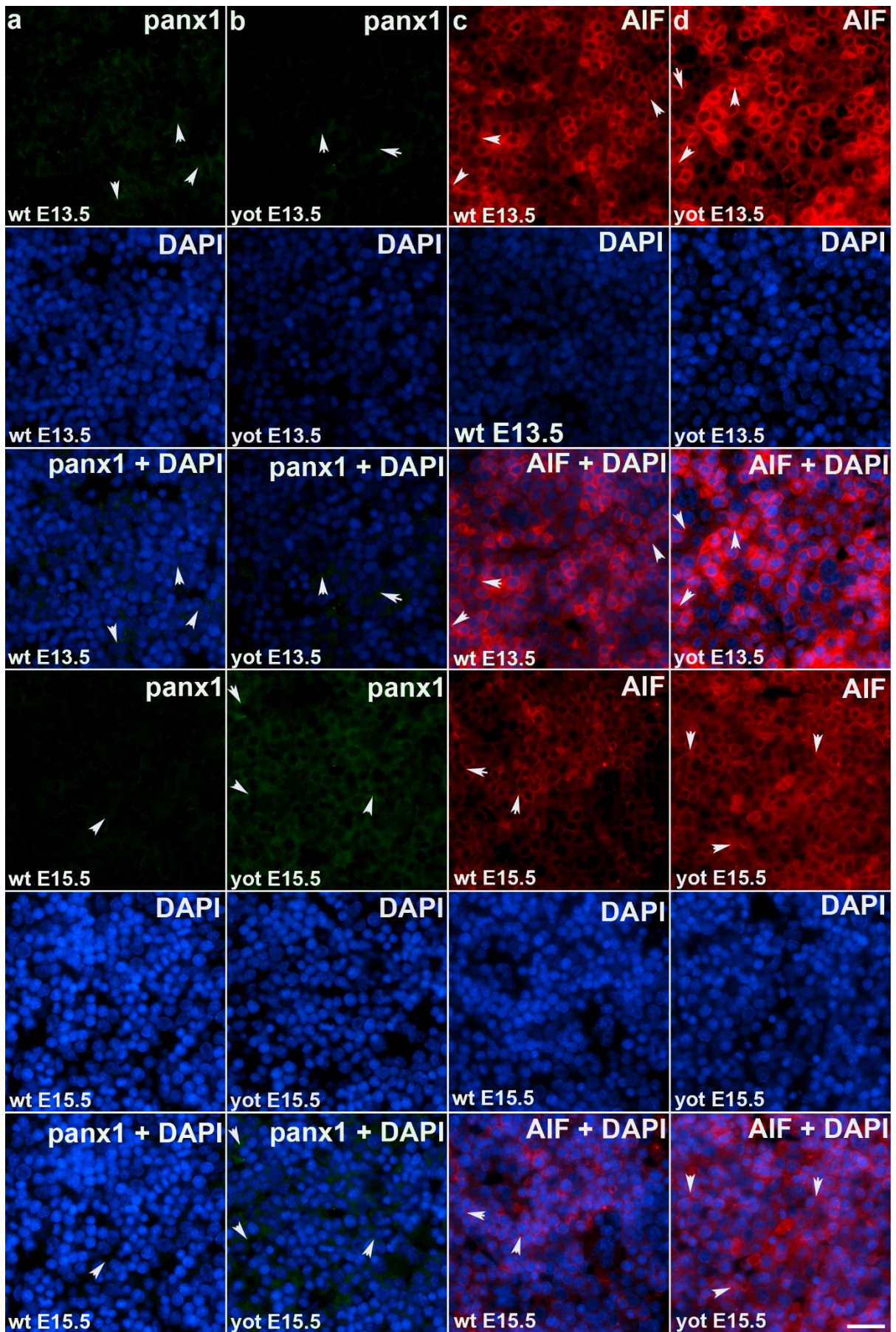
Slika 8. Imunofluorescencijsko bojanje koneksina Cx43 i Cx45 u jetri wt i *yotari* miševa u gestacijskom razdoblju E13.5 i E15.5. Imunoizražaj Cx43, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklapljenja mikrofotografija Cx43 i DAPI u E13.5 i E15.5 *wild type* (a) i *yotari* jetri (b). Imunoizražaj Cx45, DAPI bojanje i preklapljenja mikrofotografije Cx45 i DAPI u E13.5 i E15.5 wt (c) i *yotari* (d) jetri. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.

#### 4.3. Izražaj paneksina 1 (Panx1), inducirajućeg čimbenika apoptoze (AIF) i kaspaze 3 (cas3)

U oba analizirana razdoblja je izražaj Panx1 bio oprečan u embrionalnoj jetri wt i *yotari* miševa. U E13.5 Panx1 je manje izražen u jetri *yotari* miša nego u wt miša, a u E15.5 čak 21 puta veći nego u wt miša. U wt miša je značajno smanjen izražaj Panx1 u kasnijem razvojnem stadiju u odnosu na raniji stadij. Nasuprot tome, u embrionalnoj jetri *yotari* miša u E15.5 izražaj Panx1 je veći nego u E13.5 (Slika 9 a, b i Slika 10).

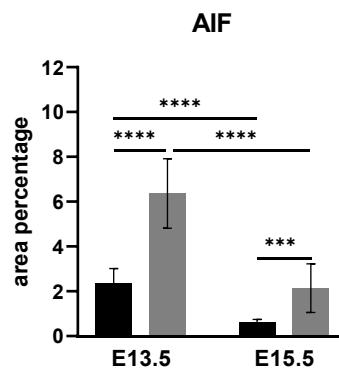
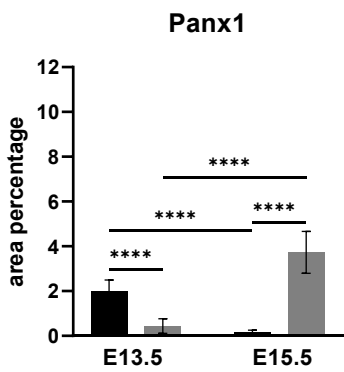
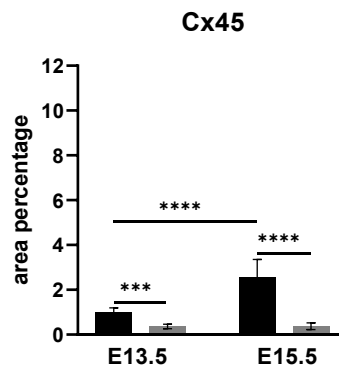
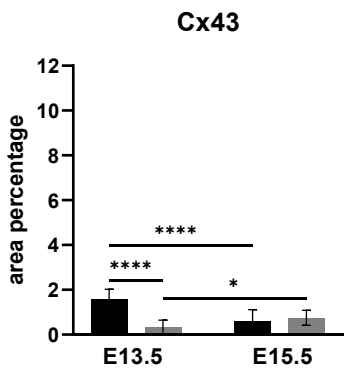
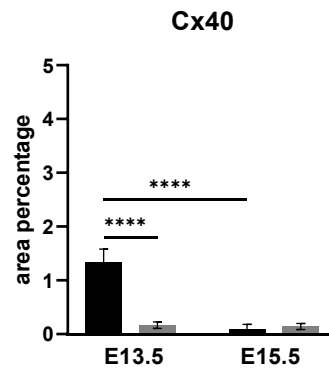
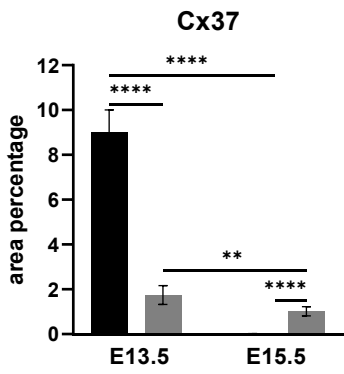
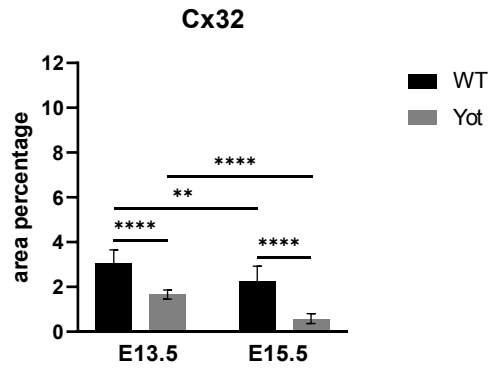
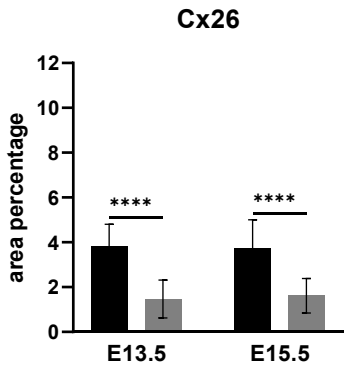
Nađen je značajno veći izražaj AIF u embrionalnoj jetri *yotari* miša nego wt miša, kako u E13.5, tako i u E15.5. U wt miša je izražaj AIF u E15.5 manji nego u E13.5. Isto vrijedi za *yotari* miševe, u čijoj je embrionalnoj jetri manji izražaj AIF u kasnijem nego u ranijem razvojnem stadiju (Slika 9 c, d i Slika 10). U ispitivanim uzorcima nije utvrđen izražaj cas3, zbog čega nije analizirana kolokalizacija s Cx43.







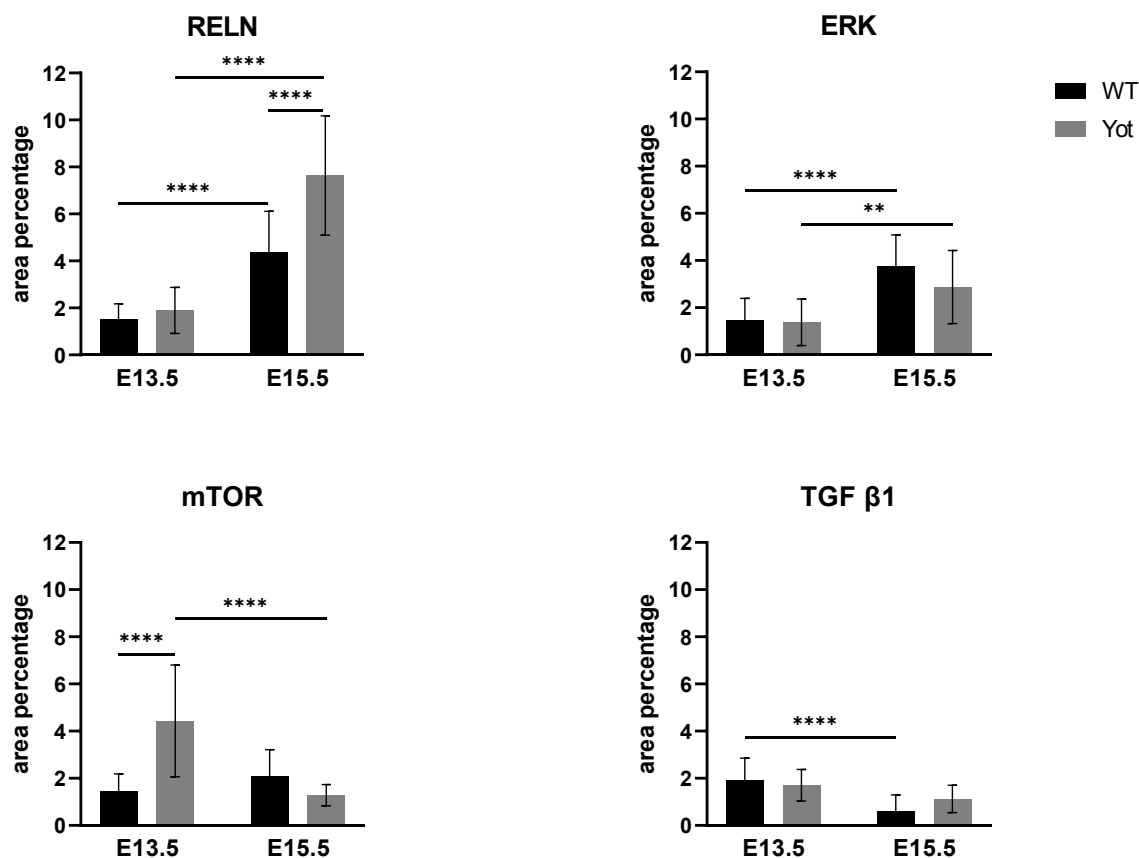
Slika 9. Imunofluorescencijsko bojanje paneksina 1 (Panx1) i inducirajućeg čimbenika apoptoze (AIF) u jetri wt i *yotari* miševa u gestacijskom razdoblju E13.5 i E15.5. Imunoizražaj Panx1, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklopljena mikrofotografija Panx1 i DAPI u E13.5 i E15.5 *wild type* (a) i *yotari* jetri (b). Imunoizražaj AIF, DAPI bojanje i preklopljene mikrofotografije AIF i DAPI u E13.5 i E15.5 wt (c) i *yotari* (d) jetri. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.



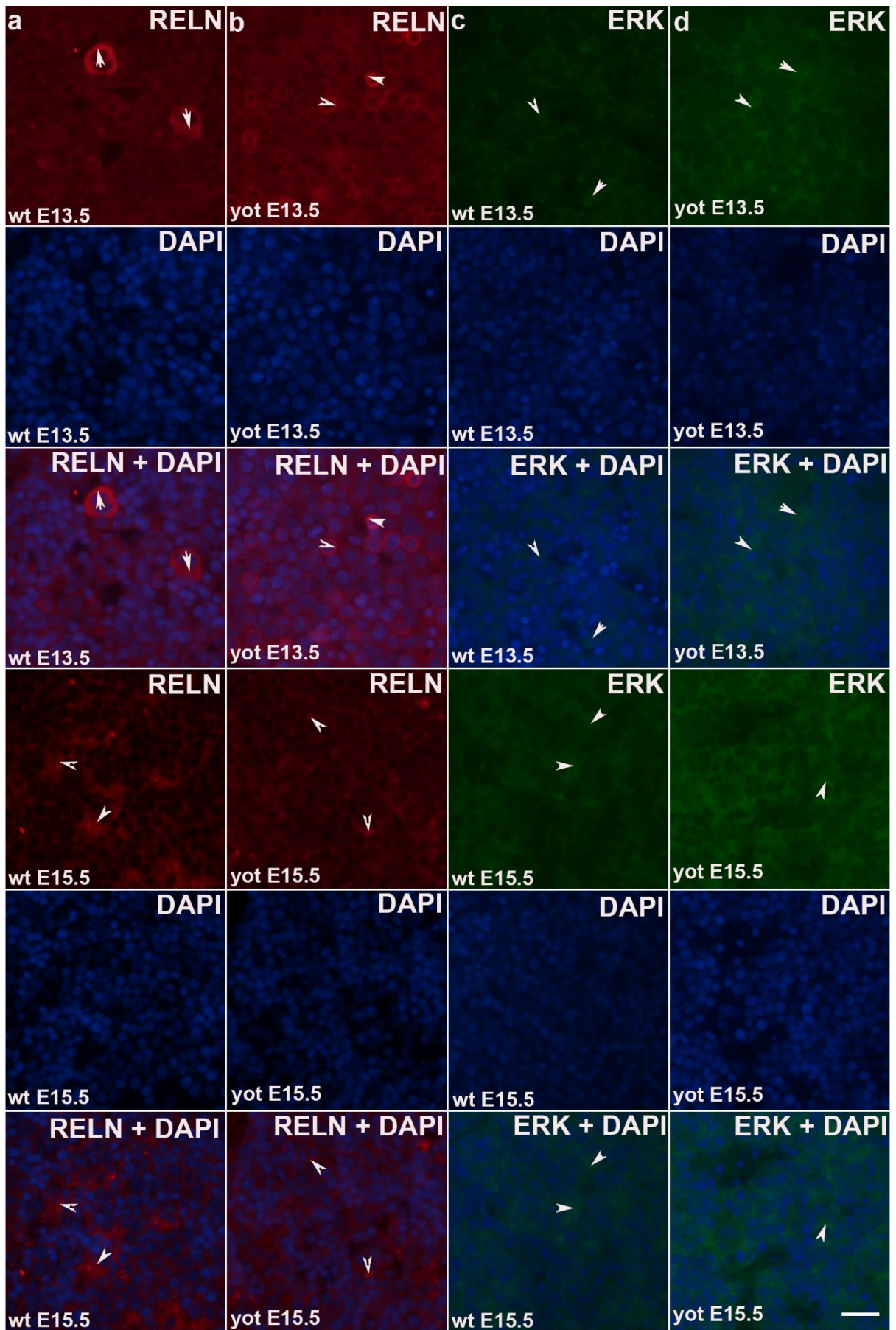
Slika 10. Postotak površine prekriven pozitivnim signalom koneksina Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, paneksina 1 (Panx1) i inducirajućeg čimbenika apoptoze (AIF) u jetri wt i *yotari* miševa u embrionalnim danima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) (vertikalna linija). Statistički značajne razlike određene su p vrijednostima: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Primijenjen je jednosmjerni (engl. *one-way*) ANOVA test praćen s Tukeyevim višestrukim testom usporedbe.

#### 4.4. Izražaj reelina (RELN), ERK, mTOR, p38, TGF- $\beta$ 1 i $\alpha$ -SMA

U E15.5 u embrionalnoj jetri *yotari* miša utvrđen je značajno veći izražaj reelina nego u wt miša (Slika 11, Slika 12 a, b). ERK i mTOR nisu slijedili obrazac izražaja reelina. Nije utvrđena razlika u izražaju ERK u embrionalnoj jetri wt i *yotari* miševa (Slika 11 i Slika 12 c, d). U E13.5 je mTOR jače izražen u jetri *yotari* miša nego wt miša (Slika 11 i Slika 13 a, b). Izražaj TGF- $\beta$ 1 u jetri *yotari* i wt miševa nije bio značajno različit u obje analizirane razvojne faze (Slika 11 i Slika 13 c, d). Nije utvrđena razlika u izražaju p38 (Slika 14) i  $\alpha$ -SMA (Slika 15), prikazanih samo u stjenci krvnih žila (Slika 15).

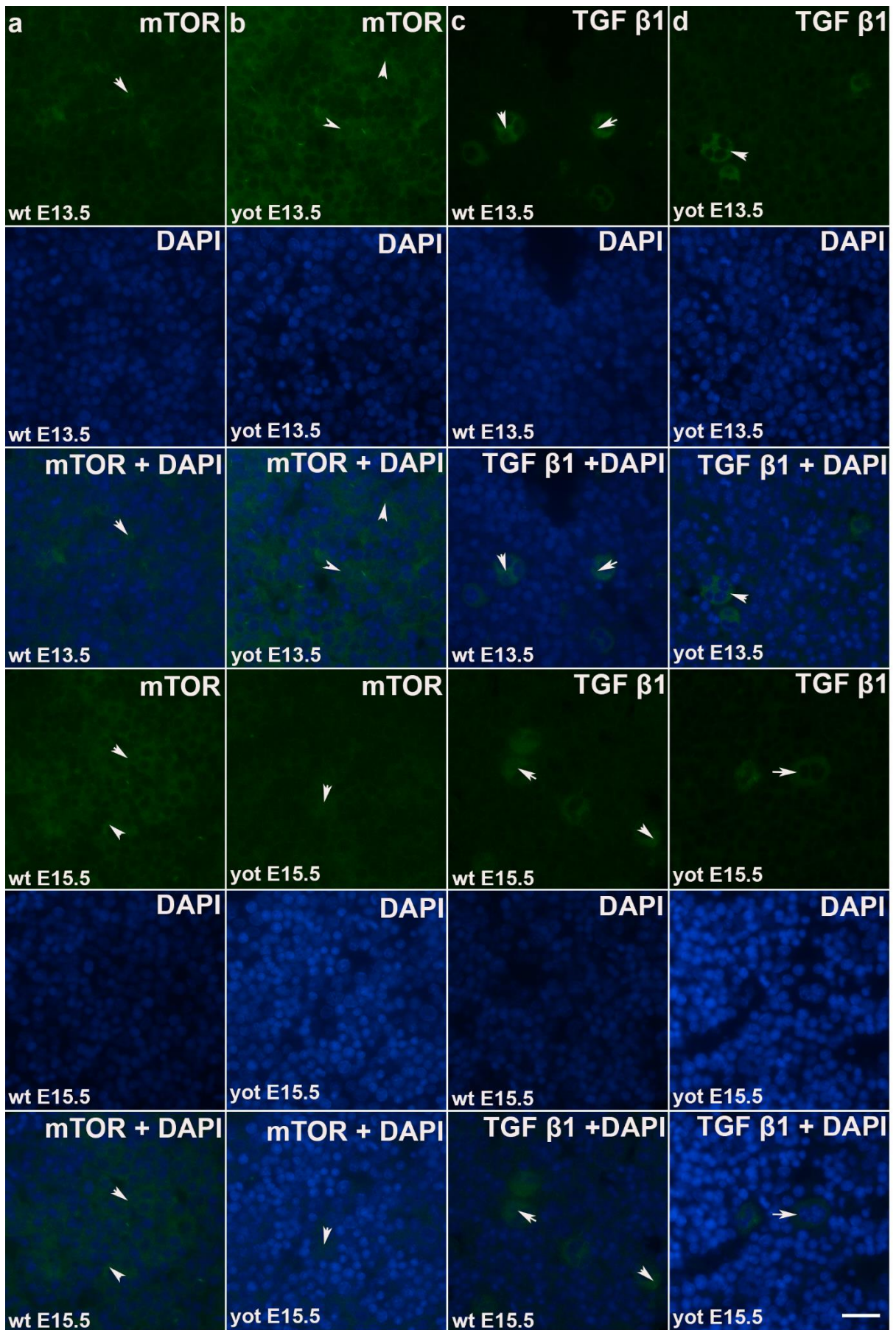


Slika 11. Postotak površine prekriven pozitivnim signalom reelina (RELN), ERK, mTOR, TGF-β1 u jetri wt i *yotari* miševa u embrionalnim razdobljima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) (vertikalna linija). Statistički značajne razlike određene su p vrijednostima: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Primijenjen je jednosmjerni (engl. *one-way*) ANOVA test popraćen s Tukeyevim višestrukim testom usporedbe.

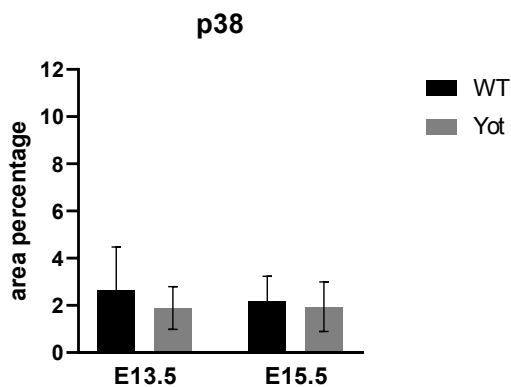


Slika 12. Imunofluorescencijsko bojanje reelina (RELN) i ERK u embrionalnoj jetri wt i *yotari* miševa u razvojnem razdoblju E13.5 i E15.5. Imunoizražaj RELN, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklopljena mikrofotografija RELN i DAPI u E13.5 i E15.5 u jetri wt (a) i *yotari* (b) miševa. Imunoizražaj ERK, DAPI bojanje i preklopljene mikrofotografije ERK i DAPI u E13.5 i E15.5 wt (c) i *yotari* (d) jetri. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.



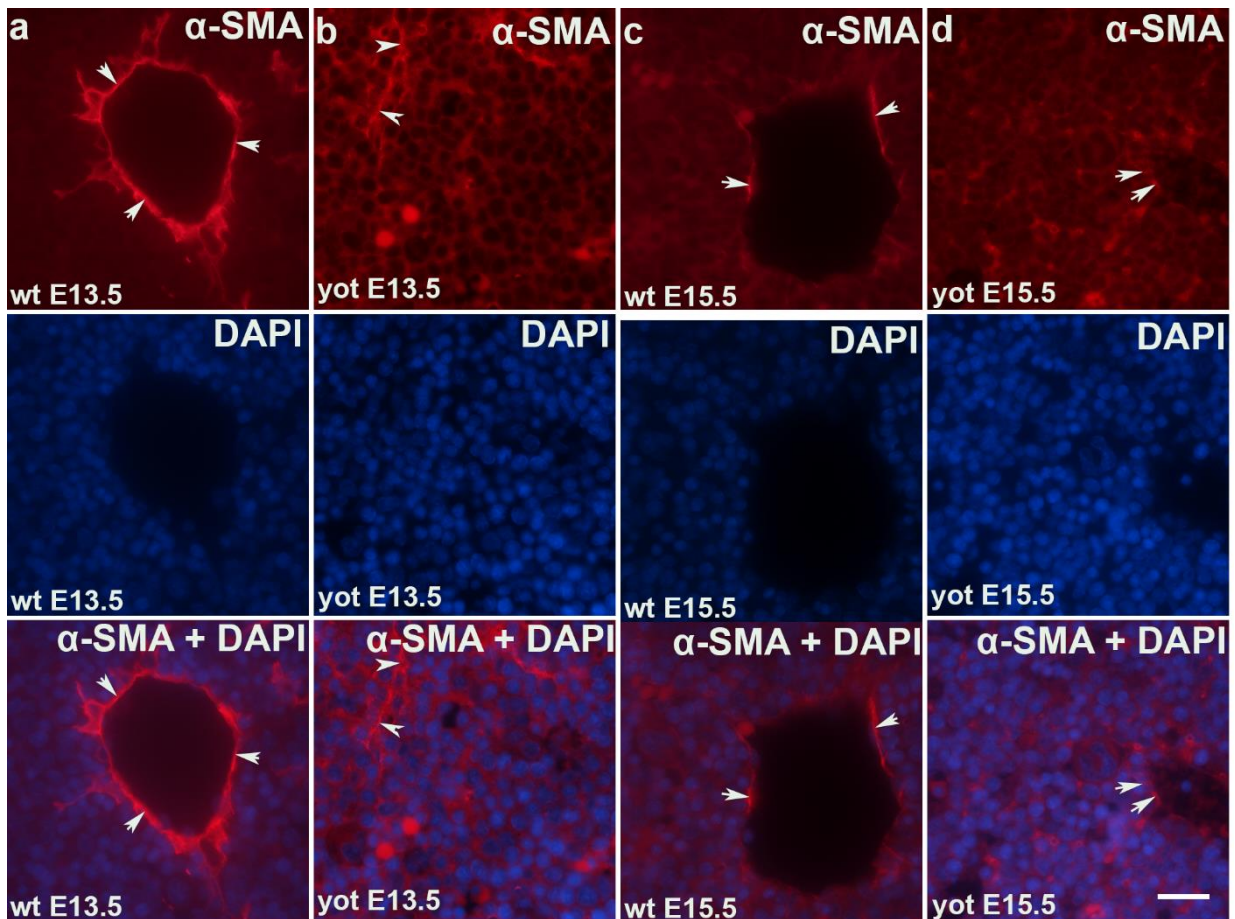


Slika 13. Imunofluorescencijsko bojanje mTOR i transformirajućeg čimbenika rasta (TGF- $\beta$ 1) u jetri wt i *yotari* miševa u razvojnom razdoblju E13.5 i E15.5. Imunoizražaj mTOR, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklopljene mikrofotografije mTOR i DAPI u E13.5 i E15.5 u jetri wt (a) i *yotari* miša (b). Imunoizražaj TGF- $\beta$ 1, DAPI bojanje i preklopljene mikrofotografije TGF- $\beta$ 1 i DAPI u E13.5 i E15.5 u embrionalnoj jetri wt (c) i *yotari* (d) miša. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.



Slika 14. Postotak površine prekriven pozitivnim signalom p38 u jetri wt i *yotari* miševa u embrionalnim razdobljima E13.5 i E15.5. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) (vertikalna linija). Primijenjen je jednosmjerni (engl. *one-way*) ANOVA test popraćen s Tukeyevim višestrukim testom usporedbe.





Slika 15. Imunofluorescencijsko bojanje glatkog mišićnog aktina ( $\alpha$ -SMA) u jetri wt i *yotari* miševa gestacijskih razdoblja E13.5 i E15.5. Imunoizražaj  $\alpha$ -SMA, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorida (DAPI) bojanje i preklopljene mikrofotografija  $\alpha$ -SMA i DAPI u E13.5 *wild type* (a) i *yotari* jetri (b). Imunoizražaj  $\alpha$ -SMA, DAPI bojanje i preklopljene mikrofotografije  $\alpha$ -SMA i DAPI u E15.5 wt (c) i *yotari* (d) jetri. Mjerna trakica je 8 $\mu$ m i odnosi se na sve slike. Povećanje: 100x.

Tablica 2. Izražaj proteina u jetrama *wild type* (wt) i *yotari* (yot) miševa embrionalnih dana E13.5 i E15.5

Protutijela	E13.5		E15.5	
	wt	yot	wt	yot
Cx26	↑	↓	↑	↓
Cx32	↑	↓	↑	↓
Cx37	↑	↓	↓	↑
Cx40	↑	↓	—	—
Cx43	↑	↓	—	—
Cx45	↑	↓	↑	↓
Panx1	↑	↓	↓	↑
AIF	↓	↑	↓	↑
Cas3	—	—	—	—
RELN	—	—	↓	↑
mTOR	↓	↑	—	—
p38	—	—	—	—
ERK	—	—	—	—
TGF β	—	—	—	—
α - SMA	—	—	—	—

↑ - Značajno veći izražaj između wt i yot iste dobi

↓ - Značajno manji izražaj između wt i yot iste dobi

— - Nema značajne razlike u izražaju proteina između wt i yot iste dobi

Izražaj Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 je manji u E13.5 jetrama *yotari* jedinki u odnosu na wt. Izražaj Cx26, Cx32 i Cx45 je manji u E15.5 *yotari* jetrama u odnosu na wt. Cx37 ima veći izražaj u E15.5 *yotari* jetrama nego u E15.5 wt (Tablica 2).

Panx1 pokazuje veći izražaj kod E13.5 wt jetri u odnosu na *yotari*. Suprotno, kod E15.5 veći izražaj Panx1 pokazuju *yotari* nego wt. AIF ima veći izražaj kod *yotari* jetri u odnosu na wt kako u E13.5 tako i u E15.5. Izražaj kaspaze 3 nije potvrđen ni kod wt ni yot jedinki (Tablica 2).

Reelin ima veći izražaj u jetrama *yotari* jedinki E15.5 u odnosu na wt. mTOR pokazuje veći izražaj kod E13.5 *yotari* jetri u odnosu na wt. Nema značajne razlike u izražaju p38, ERK, TGF β i α – SMA između wt i *yotari* jedinki (Tablica 2).

## 5. RASPRAVA

Pozitivni izražaj koneksina nalazi se vrlo rano tijekom embrionalnog razvoja, već u preimplantaciji i tijekom gastrulacije (7). Koneksini kao transmembranski proteini oblikuju tijesne spojeve kojima je omogućena pasivna difuzija malih hidrofilnih molekula među susjednim stanicama (8,9). Prema podacima iz literature, izražaj koneksina mijenja se u jetri tijekom organogeneze i u jetrenim bolestima, od kojih je u mnogima reelin signalni put uključen u nastanak fibroze. U disertaciji je istražena povezanost izražaja koneksina s reelin signalnim putem za kojeg je kao model izabran *yotari* (*Dab1* <sup>-/-</sup>) miš.

Dobiveni rezultati ukazuju na važnost koneksina Cx26 i Cx32 u razvoju jetre miša gestacijske dobi E13.5 i E15.5 jer je tada njihov izražaj značajno manji u *yotari* miševa nego u wt miševa. Nulta mutacija Cx26 ima za posljedicu letalni fenotip već u stadiju blastociste (6). S druge strane, delecija Cx32 nije letalna, ali se nalaze promjene u fenotipu (12). Jednogodišnji Cx32 <sup>-/-</sup> miševi imaju visoku incidenciju pojave tumora jetre (112). Smanjeno stvaranje Cx26 i Cx32 nađeno je u humanom HCC (28,113). Smanjeni izražaj Cx32 u jetri nalazi se u etiličnoj cirozi jetre i kroničnim jetrenim bolestima. U bolesnika s akutnim jetrenim bolestima, hepatitisom i kolestazom u hepatocitima je smanjen izražaj Cx26 i Cx32 (114), a povišen izražaj Cx43 (28). Cx32, glavni protein jetre koji sudjeluje u izgradnji GJ, u jetri je podjednako raspodijeljen, dok je Cx26 uglavnom izražen u acinarnoj periportalnoj regiji. Oba koneksina nalaze se na membrani hepatocita (113). Budući da diferencijacija hepatocita i epitela žučnih kanalića iz hepatoblasta počinje oko embrionalnog dana E13, nije bilo moguće točno definirati koji tip stanica izražava odgovarajuće proteine. Cx26 i Cx32 su glavni preteče GJ koji omogućavaju međustaničnu komunikaciju (GJIC, engl. *gap junction intercellular communication*), ali sudjeluju u interakcijama s drugima, primjerice mitohondrijskim proteinima (115–117). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi razjasnila uloga koneksina u stvaranju polukanala za čiju aktivaciju treba patološki okidač. Brojni izvještaji ukazuju na ulogu koneksin polukanala u procesima stanične smrti i preživljavanja (13) i tumorogenezi (120). Iako smo očekivali, nismo u ovom radu mogli utvrditi povećani izražaj koneksina u jetri *yotari* miševa u odnosu na wt miševa. Za taj odgovor trebalo bi razlikovati GJ od koneksin polukanala jer imaju različitu ulogu u stanici, ali se to imunohistokemijski nije moglo. Zato je dodatno analiziran izražaj paneksina kako bi mogli pretpostaviti potencijalno oblikovanje kanala. U E15.5 je bio značajno veći izražaj Panx1 u *yotari* miša nego u wt miša, čime je naša pretpostavka potvrđena. Checkeni i suradnici pokušali su razjasniti ulogu paneksin kanala u apoptotičnim stanicama. Istraživali su otpuštanje nukleotida u apoptotičnim stanicama koristeći inhibitore kanala zajedno s inhibitorima

egzocitoze i „*membrane blebbing*“, kako bi isključili otpuštanje nukleotida tim putovima. Pokazali su da Panx1 sudjeluje u otpuštanju ATPa (24,118) i UTP u apoptotičnim stanicama metodom utišavanja (engl. *knockdown*) i farmakološkim inhibitorima. To su karbenoksolon (CBX) koji inhibira koneksin i paneksin kanale, te probenecid kao specifični inhibitor paneksina (17). Potrebno je daljnje istraživanje koneksin i paneksin (polu)kanala kako bi se rasvijetlila njihova uloga u fiziološkim i patološkim uvjetima (18). U ovom radu je u E15.5 utvrđen porast izražaja Panx1 u *yotari* miševa u usporedbi s wt miševima, moguće zbog kašnjenja u razvoju u usporedbi s wt miševima, u kojima je izražaj Panx1 prisutan u E13.5. Pokazano je da Panx1 pospješuje aktivaciju inflammasoma (28).

Cx37 je jako izražen u jetri wt miša E13.5, dok je u E15.5 njegov izražaj neznatan. U *yotari* miša je u E13.5 utvrđen značajno manji izražaj Cx37 nego u wt miša. Nasuprot tome, u E15.5, veći izražaj Cx37 pokazuju *yotari* miševi, u wt mišu je neznatan. Smanjeni izražaj Cx37 nađen je u hepatalnom angiosarkomu štakora i nije bio povezan s genskom mutacijom (119), što potvrđuje njegovu ulogu u GJIC. Veće koncentracije Cx37 transkripata nađene su u koži, mozgu i bubregu mišjih embrija nego odrasle jedinke (120). Prema našim rezultatima, u wt miševa je u ranijoj embrionalnoj fazi razvoja jetre izražaj Cx37 veći nego u kasnijoj fazi, E15.5. Mnoga istraživanja ukazuju na ulogu Cx37 (121), Cx40 (122,123) i Cx43 u razvoju krvnih žila (124,125). Prema našim rezultatima, sva tri spomenuta koneksina najveći izražaj pokazuju u wt E13.5 i značajan pad u *yotari* iste dobi. U jetri miša su od početka razvoja portalnih vena (E11.5) izraženi Cx37 i Cx40, dok u jetrenoj veni i sinusoidama izražaj nije nađen (126). Cx37 *-/-* Cx40 *-/-* miš ima vaskularne nepravilnosti i umire u perinatalnoj dobi. Delecija Cx37 smanjuje izražaj Cx40 i obrnuto, što potvrđuje njihovu međuovisnost (122). Progenitorske stanice jetre štakora izražavaju Cx43 koji tijekom diferencijacije ovalnih stanica u hepatocyte prelazi u sintezu Cx32. Štoviše, najviše vrijednosti transkripata Cx43 uočene su tijekom proliferacije ovalnih stanica (E8-13), nakon čega izražaj slabi tijekom njihove diferencijacije u hepatocyte (11). Ti rezultati su sukladni našim rezultatima jer je najviši izražaj Cx43 u wt miša u E13.5, a značajni pad izražaja u E15.5. U wt miša je izražaj Cx32 veći od izražaja Cx43 u obje razvojne faze. Prema Pei i suradnicima, proces preokreta sinteze s Cx43 na Cx32 tijekom diferencijacije fetalnih progenitorskih stanica u hepatocyte pospješjen je inhibicijom p38 MAPK signalnog puta (127).

U našem radu nađen je manji izražaj Cx43 u *yotari* miša u E13.5 nego u wt miša. U jetri glodavaca tretiranih acetaminofenom nađen je povišen izražaj Cx43. Kolokalizacija s kaspazom 3 u jetri

štakora upućuje na ulogu Cx43 u staničnoj smrti. Hepatociti Cx32 *-/-* miševa rjeđe umiru apoptozom nakon tretiranja acetaminofenom, a Cx32 *-/-* štakori imaju manje oštećenu jetru nego wt miševi. S druge strane, u Cx43 *-/-* miševa češća je stanična smrt, oksidativni stres i upalni procesi nego u wt miša. Prema Crespo Yaguas i suradnicima, to upućuje na ulogu Cx32 u širenju štetnih glasnika ili uklanjanju mrtvih stanica. U stanicama HCC smanjena je proizvodnja Cx26 zbog DNA metilacije, Cx32 lokaliziran u citoplazmi, a Cx43 u citoplazmi i staničnoj membrani (28).

U dostupnoj literaturi nismo našli istraživanja o ulozi Cx45 u jetri. U wt miševa utvrdili smo veći izražaj Cx45 u E15.5 nego u E13.5. U *yotari* miševa utvrdili smo manji izražaj Cx45 nego u wt miševa i to u oba razvojna doba. Važno je naglasiti da GJ mogu biti sastavljeni od istih i različitih vrsta koneksina. Indukcija Cx45 povećava izražaj Cx43 i Cx45 u epitelnim stanicama jetre štakora (128). Budući da nismo radili kolokalizaciju koneksina, ne možemo potvrditi je li Cx45 bio dio heterotipskog GJ. Takva su istraživanja rađena u HeLa stanicama i stanicama embrionalnog i zrelog srca miša, gdje se posebno opisuju elektrofiziološka svojstva spomenutog koneksina (129,130).

Iako nisu utvrđene razlike u morfologiji jetre između *yotari* i wt miša, po rezultatima analize izražaja koneksina može se reći da je stanična komunikacija narušena.

Inducirajući čimbenik apoptoze (AIF) je mitohondrijska oksidoreduktaza koja se tijekom apoptoze i disipacije mitohondrijskog membranskog potencijala, translocira u jezgru kaspaza-neovisnim putem (131). Dokazali smo značajan porast izražaja AIF u jetri *yotari* miša za razliku od wt miša, te citoplazmatsku lokaciju tog proteina. U ispitivanim razvojnim fazama *yotari* miševi imaju jači izražaj AIF od wt miševa u istoj razvojnoj dobi. Ne može se iz navedenog zaključiti da su *yotari* skloniji apoptozi, jer je AIF lokaliziran u citoplazmi, a ne u jezgri. Analiza izražaja kaspaze 3, koja pripada različitom apoptotskom putu od AIF, nije dala odgovor jesu li *yotari* miševi skloniji apoptozi.

Iako Dab1 nije u njoj bio prvo otkriven, upravo je jetra mjesto proizvodnje reelina (132). U istraživanjima je potvrđen izražaj Dab1 u jetrenim progenitorskim stanicama u duktularnoj reakciji i pretpostavljeno je sudjelovanje reelina u popravljanju oštećenih hepatocita i fibrogenezi aktivacijom Ito stanica. Istaknuto je parakrino djelovanje reelina koji je pojačano izraženo u fibrozi. S obzirom da reelin aktivira humane progenitorske stanice u oštećenju jetre, broj Ito stanica koje izražavaju reelin povećava se kako fibroza napreduje pa reelin može

poslužiti kao potencijalni pokazatelj patologije jetre (108). Tijekom rane organogeneze u ljudi i štakora izražaj reelina pozitivan je u Ito stanicama, a ne hepatocitima (105). Nasuprot tome, tijekom oštećenja jetre povećan je izražaj reelina u hepatocitima i neparenhimskim stanicama (104). Dodatno, reelin je otkriven u endotelu tijekom razvoja sinusoida u embriju miša (87).

Reelin je iznimno važan za razvoj mozga. Glavni reelin signalni put koji regulira migraciju neurona uključuje apolipoprotein E receptor 2 (ApoEr2) i lipoproteinski receptor jako niske gustoće (VLDLR), Src/Fyn kinaze, Dab1 unutarstanični adaptor i nizvodno Crk/Rap1 i adhezijske molekule. Signalni put vezan za razvoj dendrita uključuje PI3K/Akt/mTOR, a reelin signalni put koji potiče sinaptičku plastičnost ide nizvodno preko NMDAR ili nepoznatog receptora (ne kanonski put) i aktivira MEK/Erk1/2 (60). Analizirali smo izražaj mTOR u wt i *yotari* miševa jer reelin aktivira PI3K/Akt/mTOR put koji je često hiperaktiviran u tumorima. Također smo uzeli u obzir izražaj ERK jer taj signalni put vrlo vjerojatno ne uključuje Dab1. Nismo pronašli značajne razlike između wt i *yotari* miševa u izražaju navedenih proteina. Jedino povećanje izražaja pokazao je mTOR u E13.5 u *yotari* u usporedbi s wt mišem. PI3K/AKT, AMPK, Ras/Raf/MEK/ERK su neki od uzvodnih putova istraženih u jetrenim bolestima kroz regulaciju mTOR-posredovane autofagije (133). Povećani izražaj mTOR u E13.5 u *yotari* miša ne odgovara na pitanje o potencijalnoj hiperaktivaciji reelina kojoj bi mTOR bio posrednik. Iako je ERK bio predložen kao sudionik reelin signalnog puta u kojem nije prisutan Dab1, izražaj ERK nije se razlikovao u ispitivanim skupinama. Nije utvrđena razlika u izražaju p38. Povezanost Dab1 i p38, bar po pitanju naših saznanja iz dostupne literature, je iz područja nefropatologije. Pokazano je da smanjena regulacija Dab1 inhibira fosforilaciju p38, što ne utječe na fosforilaciju ERK i ukazuje da je Dab1 uključen u angiotenzinom II – potaknutu apoptozu podocita kroz p38 signalni put (134).

Ne zna se dovoljno o reelin signaliziranju u jetri, ali su nađene povišene vrijednosti reelina u krvi bolesnika s cirozom i fibrozom jetre i još više vrijednosti u bolesnika s HCC (135). Slične rezultate spominje studija u kojoj je prekomjerni izražaj reelina utvrđen u jetri bolesnika s cirozom i promjene u glikozilaciji u plazmi bolesnika s cirozom (99). Naši rezultati pokazali su povišeni izražaj reelina u *yotari* miša u E15.5 u odnosu na wt miša. Time je potvrđena pretpostavka da je reelin uključen u patologiju jetre, ali točan mehanizam tek treba biti objašnjen. TGF- $\beta$ 1 u hepatocitima odgovoran je za fenotip miofibroblasta u koji se transformiraju Ito stanice i stvaraju proteine ekstracelularnog matriksa tijekom fibroze. TGF- $\beta$ 1 je posrednik u epitelno-

mezenhimske pretvorbi tumorskih stanica kojom se povećava broj miofibroblasta (136). Smanjen izražaj RELN nađen je u raku dojke, gušterače i želuca. TGF- $\beta$ 1 je uzvodno od reelina i suprimira njegov izražaj, što rezultira povećanom migracijom stanica HCC (137). Slični rezultati nađeni su u stanicama raka jednjaka u kojima je izražaj reelina potisnuo migraciju potaknutu s TGF- $\beta$ 1 (138). U razvoju intrahepatičnih žučnih vodova imaju ulogu signalni put TGF- $\beta$ 1 i alfa glatkomišićni aktin u portalnim venama neposredno uz žučne vodove. Mutacija TGF- $\beta$ 1 ili njegovog receptora u miša između E9.5 i E10.5 (prije razvoja intrahepatičnih žučnih vodova) vodi u smrt. Blokada TGF- $\beta$ 1 signalnog puta u E10.5 izaziva defekt žučnih vodova u hilusu portalnih vena, te inhibiciju diferencijacije stanica žučnog epitela. Portalni miofibroblasti koji izražavaju  $\alpha$ -SMA nađeni su u portalnim venama mezenhima neposredno kraj kolangiocita, između E14.5-E18.5 (139). Naši rezultati potvrđuju izražaj  $\alpha$ -SMA u blizini portalnih vena i duž krvnih žila u wt i *yotari* miševa. Iako je TGF- $\beta$ 1 biljeg upale i sudionik reelin signalnog puta, nismo našli značajne razlike u njegovu izražaju između ispitivanih skupina.

Stanična komunikacija je posebno važna u embrionalnom razvoju jetre. Izražaj gotovo svih analiziranih koneksina je manji u *yotari* miševa nego u wt miševa. Time je potvrđena hipoteza da je promjenjen izražaj koneksina *yotari* miševa i narušena stanična komunikacija unatoč tome što histološke razlike u jetri nisu uočene. Izuzetno, u danu E15.5 koneksin Cx37 pokazuje veći izražaj u *yotari* mišu nego u wt mišu u kojem je neznatan. Moguće je da se radi o kompenzatornom učinku kad zbog nedostatka različitih Cxs bude povišen izražaj Cx37. S obzirom na rezultate izražaja AIF, cas3 i Panx1, ne može se zaključiti da su *yotari* miševi skloniji apoptozi u jetri kad su u pitanju embrionalni stadiji E13.5 i E15.5. Povišeni izražaj Panx1 u E15.5 *yotari* mišu moguće doprinosi stvaranju Panx1 kanala koji sudjeluju u apoptozi kao glavni kanali za otpuštanje ATPa. Veći izražaj reelina u jetri *yotari* miša nego u wt miša u kasnijoj razvojnoj fazi upućuje na ulogu reelina u patologiji jetre. Koneksini i paneksini sudjeluju u održavanju homeostaze jetre i mogu služiti kao potencijalni dijagnostički biljezi u jetrenim bolestima. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrila povezanost reelin signaliziranja s GJIC, kako u kongenitalnim greškama u razvoju jetre, tako i ulozu nakon oštećenja jetre.



## 6. ZAKLJUČCI

- 1) Koneksini Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 imaju manji izražaj u embrionalnoj jetri *yotari* miša nego u wt miša u E13.5.
- 2) Koneksini Cx26, Cx32 i Cx45 imaju manji izražaj u embrionalnoj jetri *yotari* miša nego u wt miša u E15.5.
- 3) Cx37 ima veći izražaj u embrionalnoj jetri *yotari* miša nego u wt miša u E15.5.
- 4) Nema značajne razlike u izražaju Cx40 i Cx43 u embrionalnoj jetri između wt i *yotari* u E15.5.
- 5) Koneksini Cx32, Cx37, Cx40 i Cx43 imaju manji izražaj u wt E15.5 embrionalnih jetri u usporedbi s wt E13.5.
- 6) Od svih ispitivanih koneksina, samo Cx45 pokazuje veći izražaj u wt E15.5 jetrama u usporedbi s wt E13.5.
- 7) Izražaj paneksina 1 i inducirajućeg čimbenika apoptoze je veći u *yotari* miševa nego u wt miševa u danu E15.5, a AIF-a u oba razdoblja, E13 i E15.5.
- 8) Nije nađena značajna razlika između wt i *yotari* miševa u izražaju ERK i p38.
- 9) Reelin ima veći izražaj kod *yotari* E15.5 u usporedbi s wt iste dobi, a kod E13.5 nema značajne razlike u izražaju.
- 10) mTOR je pokazao veći izražaj kod E13.5 *yotari* nego wt, dok kod E15.5 nema značajne razlike.
- 11) Izražaj  $\alpha$ -SMA je utvrđen u blizini portalnih vena i duž krvnih žila u wt i *yotari* miševa. Nije utvrđena razlika u izražaju  $\alpha$ -SMA i TGF- $\beta$ 1 između wt i *yotari* miševa.
- 12) Nije utvrđen izražaj kaspaze 3.
- 13) Histološka građa embrionalne jetre *yotari* i wt miševa u dva različita gestacijska razdoblja, E13.5 i E15.5 se značajno ne razlikuje.

## SAŽETAK

Dab1 protein (Disabled-1) je unutarstanični adaptor reelin signalnog puta koji sudjeluje u prenatalnoj migraciji neurona, neurotransmisiji, formiranju pamćenja i sinaptičkoj plastičnosti. *Yotari* je autosomno recesivna mutanta mišjeg *Dab1* gena koju fenotipski karakterizira nestabilan hod, tremor i prerana smrt. Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila vezana za neurološke nepravilnosti uzrokovane mutacijom *Dab1*, a uloga reelin signalnog puta u tkivima i organima izvan živčanog sustava nije ispitivana. Hepatociti, najbrojnije stanice jetre komuniciraju putem pukotinastih veza (GJ, engl. *gap junction*) sastavljenih od koneksina. U ovom radu istražen je poremećaj u staničnoj komunikaciji u *yotari* miševima analizom izražaja koneksina (Cxs) Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 tijekom razvoja jetre embrionalnih dana E13.5 i E15.5. Korištena je imunofluorescentna metoda, analiza urađena na svjetlosnom i fluorescencijskom mikroskopu, a rezultat kvantificiran kao površina vidnog polja prekrivena pozitivnim signalom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD (standardna devijacija) korištenjem jednosmjernog ANOVA testa. Svi ispitani koneksini bili su značajno manje izraženi u *yotari* miševa u usporedbi s kontrolnom wt skupinom u E13.5. Izražaj koneksina u E15.5 je sličan, s izuzetkom Cx37 koji u wt miša pokazuje neznatan izražaj. Stvaranje kanala u patološkim uvjetima i sklonost apoptozi istraženi su analizom izražaja paneksina 1 (Panx1), inducirajućeg čimbenika apoptoze (AIF) i kaspaze 3 tijekom navedenih embrionalnih razdoblja. Porast izražaja Panx1 u E15.5 u *yotari* miševa, te veći izražaj AIF u oba razdoblja daje pretpostavku da su *yotari* skloniji apoptozi. Naši rezultati ističu važnost međustanične komunikacije (GJIC) tijekom razvoja jetre i njihovu moguću ulogu potencijalnih dijagnostičkih biljega u bolestima jetre.

## SUMMARY

Dab1 protein (Disabled-1) is an intracellular reelin signaling pathway adapter involved in prenatal neuronal migration, neurotransmission, memory formation, and synaptic plasticity. *Yotari* is an autosomal recessive mutant of the mouse *Dab1* gene, phenotypically characterized by unstable gait, tremor, and premature death. Previous research has been mainly related to neurological abnormalities caused by the *Dab1* mutation, and the role of the reelin signaling pathway in tissues and organs outside the nervous system has not been investigated. Hepatocytes, the most numerous liver cells, communicate through gap junctions (GJs) composed of connexins. In this study, a disorder in cellular communication in *yotari* mice was investigated by analyzing the expression of connexins (Cxs) Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 and Cx45 during embryonic day E13.5 and E15.5. Immunofluorescent method was used, analysis was performed on a light and fluorescence microscope, and the result was quantified as the surface of the field of view covered with a positive signal. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation) using a one-way ANOVA test. All tested connexins were significantly less pronounced in the *yotari* mice compared to the control wt mice in E13.5. The expression of analysed connexins in E15.5 is similar, with the exception of Cx37 which in wt mouse shows very slight expression. Channel formation under pathological conditions and propensity to apoptosis were investigated by analysis of the expression of Panexin 1 (Panx1), AIF and caspase 3 during these embryonic periods. The increase in Panx1 expression in E15.5 in the *yotari* mice, and the higher expression of AIF in both periods possibly indicate that *yotari* are more prone to apoptosis. Our results highlight the importance of intercellular communication (GJIC) during liver development and their possible role as potential diagnostic markers in liver disease.

## POPIS LITERATURE

1. Goodenough DA. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions: Characterization of the principal protein, connexin. *J Cell Biol.* 1974;61(2):557–63.
2. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2001;161(III–XIII):1–151.
3. Damania A, Jain E, Kumar A. Advancements in in vitro hepatic models: Application for drug screening and therapeutics. *Hepatol Int.* 2014;8(1):23–38.
4. Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. 2006;18:592–600.
5. Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.* 2003;10(4–6):173–80.
6. Wörsdörfer P, Wagner N, Ergün S. The role of connexins during early embryonic development: pluripotent stem cells, gene editing, and artificial embryonic tissues as tools to close the knowledge gap. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2018;150(4):327–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-018-1697-2>
7. Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: Their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1359–400.
8. Alexander D, Goldberg G. Transfer of Biologically Important Molecules Between Cells Through Gap Junction Channels. *Curr Med Chem.* 2003;10(19):2045–58.
9. Decrock E, Vinken M, Vuyst E De, Krysko D V, Herde KD, Vanhaecke T, et al. Connexin-related signaling in cell death : to live or let die ? *Cell Death Differ.* 2009;16:524–36.
10. Willebrords J, Crespo Yanguas S, Maes M, Decrock E, Wang N, Leybaert L, et al. Structure, Regulation and Function of Gap Junctions in Liver. *Cell Commun Adhes.* 2015;22(2–6):29–37.
11. Zhang, M., Thorgeirsson SS. Modulation of Connexins during differentiation of Oval Cells into Hepatocytes. *Exp Cell Res.* 1994;213(1):0–42.

12. Vinken M, De Kock J, Oliveira AG, Menezes GB, Cogliati B, Dagli MLZ, et al. Modifications in Connexin Expression in Liver Development and Cancer. *Cell Commun Adhes.* 2012;19(3–4):55–62.
13. Maes M, Decrock E, Cogliati B, Oliveira AG, Marques PE, Dagli MLZ, et al. Connexin and pannexin ( hemi ) channels in the liver. *Front Psychology.* 2014;4:1–9.
14. Dahl G, Locovei S. Pannexin: To gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life.* 2006;58(7):409–19.
15. Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282(43):31733–43.
16. D’hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: An unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal [Internet].* 2011;23(2):305–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.07.018>
17. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate “find-me” signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature [Internet].* 2010;467(7317):863–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09413>
18. D’hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Bultynck G, Himpens B. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *BioEssays.* 2009;31(9):953–74.
19. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, et al. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 2004;83(4):706–16.
20. Crespo Yanguas S, Willebrords J, Johnstone SR, Maes M, Decrock E, De Bock M, et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet].* 2017;1864(1):51–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.006>
21. Cooreman A, Van Campenhout R, Ballet S, Annaert P, Van Den Bossche B, Colle I, et al.

- Connexin and Pannexin (Hemi)Channels: Emerging Targets in the Treatment of Liver Disease. *Hepatology*. 2019;69(3):1317–23.
22. Willebrords J, Crespo Yanguas S, Maes M, Decrock E, Wang N, Leybaert L, et al. Connexins and their channels in inflammation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;51(6):413–39.
  23. Lohman AW, Isakson BE. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett* [Internet]. 2014;588(8):1379–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.004>
  24. Dosch M, Gerber J, Jebbawi F, Beldi G. Mechanisms of ATP release by inflammatory cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1–16.
  25. D’hondt C, Iyyathurai J, Vinken M, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, et al. REGULATION OF CONNEXIN- AND PANNEXIN-BASED CHANNELS BY POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS. *Biol Cell*. 2013;105(9):373–98.
  26. Van Campenhout R, Gomes AR, De Groof TWM, Muyldermans S, Devoogdt N, Vinken M. Mechanisms underlying connexin hemichannel activation in disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
  27. Vinken M, Decrock E, Leybaert L, Bultynck G, Himpens B, Vanhaecke T, et al. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2012;1818(8):2002–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.06.011>
  28. Yanguas SC, Willebrords J, Maes M, da Silva TC, Pereira IVA, Cogliati B, et al. Connexins and Pannexins in liver damage. *EXCLI J*. 2016;15:177–86.
  29. Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun*. 2017;8:1–14.
  30. Vinken M, Henkens T, De Rop E, Fraczek J, Vanhaecke T, Rogiers V. Biology and pathobiology of gap junctional channels in hepatocytes. *Hepatology*. 2008;47(3):1077–88.

31. Vinken M. Gap junctions and non-neoplastic liver disease. *J Hepatol* [Internet]. 2012;57(3):655–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.036>
32. Maes M, Crespo Yanguas S, Willebrords J, Cogliati B, Vinken M. Connexin and pannexin signaling in gastrointestinal and liver disease. *Transl Res*. 2015;166(4):332–43.
33. Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2017;180:144–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.001>
34. Tremblay KD, Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol*. 2005;280(1):87–99.
35. Zorn. Liver Development. *StemBook*. 2008;1–26.
36. Medlock ES, Haar JL. The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat Rec*. 1983;207(1):31–41.
37. Lemaigre FP. Development of the biliary tract. *Mech Dev*. 2003;120(1):81–7.
38. Shen MM. Nodal signaling: Development roles and regulation. *Development*. 2007;134(6):1023–34.
39. Zorn AM, Wells JM. Molecular Basis of Vertebrate Endoderm Development. *Int Rev Cytol*. 2007;259(06):49–111.
40. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BLM, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum, transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*. 2001;15(15):1998–2009.
41. Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD, Minowada G, Kaestner KH, Martin GR, et al. An FGF Response Pathway that Mediates Hepatic Gene Induction in Embryonic Endoderm Cells. *Dev Cell*. 2006;11(3):339–48.
42. Keng VW, Yagi H, Ikawa M, Nagano T, Myint Z, Yamada K, et al. Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(3):1155–61.
43. Burke Z, Oliver G. Prox1 is an early specific marker for the developing liver and pancreas in the mammalian foregut endoderm. *Mech Dev*. 2002;118(1–2):147–55.

44. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology*. 2005;41(5):956–67.
45. Suksaweang S, Lin CM, Jiang TX, Hughes MW, Widelitz RB, Chuong CM. Morphogenesis of chicken liver: Identification of localized growth zones and the role of  $\beta$ -catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol*. 2004;266(1):109–22.
46. Monga SPS, Monga HK, Tan X, Mulé K, Pediaditakis P, Michalopoulos GK.  $\beta$ -catenin antisense studies in embryonic liver cultures: Role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology*. 2003;124(1):202–16.
47. McLin VA, Rankin SA, Zorn AM. Repression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development*. 2007;134(12):2207–17.
48. Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SPS.  $\beta$ -Catenin Is Temporally Regulated during Normal Liver Development. *Gastroenterology*. 2004;126(4):1134–46.
49. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett*. 2001;492(1–2):90–4.
50. Michalopoulos GK, Bowen WC, Mule K, Luo J. HGF-, EGF-, and Dexamethasone-Induced Gene Expression Patterns During Formation of Tissue in Hepatic Organoid Cultures. *Gene Expr*. 2003;11(412):55–75.
51. Suzuki A, Iwana A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development*. 2003;130(11):2513–24.
52. Tan X, Yuan Y, Zeng G, Apte U, Thompson MD, Cieply B, et al. B-Catenin Deletion in Hepatoblasts Disrupts Hepatic Morphogenesis and Survival During Mouse Development. *Hepatology*. 2008;47(5):1667–79.
53. Kalinichenko V V., Zhou Y, Bhattacharyya D, Kim W, Shin B, Bambal K, et al. Haploinsufficiency of the mouse forkhead box f1 gene causes defects in gall bladder development. *J Biol Chem*. 2002;277(14):12369–74.



54. Ober EA, Lemaigre FP. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. *J Hepatol* [Internet]. 2018;68(5):1049–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.005>
55. Gerber MA, Thung SN. Histology of the liver. Vol. 11, *American Journal of Surgical Pathology*. 1987. p. 709–22.
56. Henriksen JH, Horn T, Christoffersen P. The blood-lymph barrier in the liver. A review based on morphological and functional concepts of normal and cirrhotic liver. *Liver*. 1984;4(4):221–32.
57. Jones EA. Hepatic Sinusoidal Cells: New Insights and Controversies. *Hepatology*. 1983;3(2):259–66.
58. Wisse E, de Zanger RB, Charels K, van der Smissen P, McCuskey RS. The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse. *Hepatology*. 1985;5(4):683–92.
59. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Bradamante, Ž., Kostović-Knežević L. *Osnove histologije*. 10th ed. Krznarić-Vohalski G, editor. Zagreb: Školska knjiga; 2005. 510 p.
60. Lee GH, D’Arcangelo G. New insights into reelin-mediated signaling pathways. *Front Cell Neurosci*. 2016;10(MAY):1–8.
61. D’Arcangelo G. Reelin in the Years: Controlling Neuronal Migration and Maturation in the Mammalian Brain. *Adv Neurosci*. 2014;2014:1–19.
62. Sato Y, Kobayashi D, Kohno T, Kidani Y, Prox J, Becker-Pauly C, et al. Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprip metalloproteases to the cleavage. *J Biochem*. 2015;159(3):305–12.
63. Jossin Y, Ignatova N, Hiesberger T, Herz J, Lambert De Rouvroit C, Goffinet AM. The Central Fragment of Reelin, Generated by Proteolytic Processing in Vivo, Is Critical to Its Function during Cortical Plate Development. *J Neurosci*. 2004;24(2):514–21.
64. D’Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Scares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Vol. 374, *Nature*. 1995. p. 719–23.

65. Hirota, Yuki; Kubo, Ken-ichiro; Katayama, Kei-ichi; Honda, Takao; Fujino, Takahiro; Yamamoto, Tokuo T.; Nakajima K. Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are expressed in distinct spatio-temporal patterns in developing mouse cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 2015;523(3):463–78.
66. Goffinet AM. The embryonic development of the cerebellum in normal and reeler mutant mice. *Anat Embryol (Berl)*. 1983;168(1):73–86.
67. Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K, Ogawa M. Regulation of Purkinje cell alignment by Reelin as revealed with CR-50 antibody. *J Neurosci*. 1997;17(10):3599–609.
68. Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, et al. REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. *Mol Interv*. 2002;2(1):47–57.
69. Dazzo E, Fanciulli M, Serioli E, Minervini G, Pulitano P, Binelli S, et al. Heterozygous Reelin Mutations Cause Autosomal-Dominant Lateral Temporal Epilepsy. *Am J Hum Genet [Internet]*. 2015;96(6):992–1000. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.04.020>
70. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature [Internet]*. 2014;515(7526):209–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13772>
71. Durakoglugil MS, Chen Y, White CL, Kavalali ET, Herz J. Reelin signaling antagonizes  $\beta$ -amyloid at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15938–43.
72. Krstic D, Rodriguez M, Knuesel I. Regulated Proteolytic Processing of Reelin through Interplay of Tissue Plasminogen Activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and Their Modulators. *PLoS One*. 2012;7(10):1–11.
73. Pujadas L, Rossi D, Andrés R, Teixeira CM, Serra-Vidal B, Parcerisas A, et al. Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2014;5.
74. Lane-Donovan C, Philips GT, Wasser CR, Durakoglugil MS, Masiulis I, Upadhaya A, et al. Reelin protects against amyloid  $\beta$  toxicity in vivo. *Sci Signal*. 2015;8(384):1–13.

75. Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, et al. Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*. 1999;97(6):689–701.
76. Howell BW, Gertler FB, Cooper JA. Mouse disabled (mDab1): A Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J*. 1997;16(1):121–32.
77. Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA. Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. *Curr Biol*. 2000;10(15):877–85.
78. Kuo G, Arnaud L, Kronstad-O'Brien P, Cooper JA. Absence of Fyn and Src causes a Reeler-like phenotype. *J Neurosci*. 2005;25(37):8578–86.
79. Neural AM, Culture C, Approach AP, Sheldon M, Rice DS, Arcangelo GD, et al. Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler -like phenotype in mice. *Nature*. 1997;389(October):1995–8.
80. Ware ML, Fox JW, González JL, Davis NM, Lambert De Rouvroit C, Russo CJ, et al. Aberrant splicing of a mouse disabled homolog, mdab1, in the scrambler mouse. *Neuron*. 1997;19(2):239–49.
81. Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T, et al. A novel neurological mutant mouse, yotari, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/Reelin. *Neurosci Res*. 1997;29(3):217–23.
82. Kojima T, Nakajima K, Mikoshiba K. The disabled 1 gene is disrupted by a replacement with L1 fragment in yotari mice. *Mol Brain Res*. 2000;75(1):121–7.
83. Feng L, Allen NS, Simo S, Cooper JA. Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development. *Genes Dev*. 2007;21(21):2717–30.
84. Sweet HO, Bronson RT, Johnson KR, Cook SA, Davisson MT. Scrambler, a new neurological mutation of the mouse with abnormalities of neuronal migration. *Mamm Genome*. 1996;7(11):798–802.
85. Khialeeva E, Carpenter EM. Nonneuronal roles for the reelin signaling pathway. *Dev Dyn*. 2017;246(4):217–26.

86. Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, et al. The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. *Nat Genet.* 1995;10(1):77–83.
87. Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn.* 1997;210(2):157–72.
88. Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, et al. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet.* 2004;36(7):683–5.
89. Rawlinson SCF, McKay IJ, Ghuman M, Wellmann C, Ryan P, Prajaneh S, et al. Adult rat bones maintain distinct regionalized expression of markers associated with their development. *PLoS One.* 2009;4(12).
90. Garcia-Miranda P, Peral MJ, Ilundain AA. Rat small intestine expresses the reelin-Disabled-1 signalling pathway. *Exp Physiol.* 2010;95(4):498–507.
91. Lutter S, Xie S, Tatin F, Makinen T. Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *J Cell Biol.* 2012;197(6):837–49.
92. Rebutini IT, Hayashi T, Reynolds AD, Dillard ML, Carpenter EM, Hoffman MP. miR-200c regulates FGFR-dependent epithelial proliferation via Vldlr during submandibular gland branching morphogenesis. *Development.* 2012;139(1):191–202.
93. Díaz-Mendoza MJ, Lorda-Diez CI, Montero JA, García-Porrero JA, Hurlé JM. Interdigital cell death in the embryonic limb is associated with depletion of Reelin in the extracellular matrix. *Cell Death Dis.* 2013;4(9):1–7.
94. Ma Y, Li X, Fu J, Li Y, Gao L, Yang L, et al. Acetylcholine affects osteocytic MLO-Y4 cells via acetylcholine receptors. *Mol Cell Endocrinol [Internet].* 2014;384(1–2):155–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.021>
95. Vázquez-Carretero MD, García-Miranda P, Calonge ML, Peral MJ, Ilundain AA. Dab1 and reelin participate in a common signal pathway that controls intestinal crypt/villus unit dynamics. *Biol Cell.* 2014;106(3):83–96.

96. Wang Q, Lu J, Yang C, Wang X, Cheng L, Hu G, et al. CASK and its target gene Reelin were co-upregulated in human esophageal carcinoma. *Cancer Lett.* 2002;179(1):71–7.
97. Perrone G, Vincenzi B, Zagami M, Santini D, Panteri R, Flammia G, et al. Reelin expression in human prostate cancer: A marker of tumor aggressiveness based on correlation with grade. *Mod Pathol.* 2007;20(3):344–51.
98. Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis.* 2007;13(June):823–32.
99. Botella-López A, de Madaria E, Jover R, Bataller R, Sancho-Bru P, Candela A, et al. Reelin is overexpressed in the liver and plasma of bile duct ligated rats and its levels and glycosylation are altered in plasma of humans with cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(4):766–75.
100. Magnani A, Pattacini L, Boiardi L, Casali B, Salvarani C. Reelin levels are increased in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(4):546–8.
101. Stein T, Cosimo E, Yu X, Smith PR, Simon R, Cottrell L, et al. Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol [Internet].* 2010;177(5):2323–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100209>
102. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature [Internet].* 2012;481(7380):157–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10725>
103. Mansy SS, Nosseir MM, Zoheiry MA, Hassanein MH, Guda MF, Othman MM, et al. Value of reelin for assessing hepatic fibrogenesis in a group of Egyptian HCV infected patients. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(9):1319–28.
104. Kobold D, Grundmann A, Piscaglia F, Eisenbach C, Neubauer K, Steffgen J, et al. Expression of reelin in hepatic stellate cells and during hepatic tissue repair: A novel marker for the differentiation of HSC from other liver myofibroblasts. *J Hepatol.* 2002;36(5):607–13.

105. Samama B, Boehm N. Reelin immunoreactivity in lymphatics and liver during development and adult life. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005;285(1):595–9.
106. Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA. A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology.* 2004;40(5):1151–9.
107. Endo Y, Zhang M, Yamaji S, Cang Y. Genetic abolishment of hepatocyte proliferation activates hepatic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(2):1–11.
108. Carotti S, Perrone G, Amato M, Gentilucci UV, Righi D, Francesconi M, et al. Reelin expression in human liver of patients with chronic hepatitis C infection. *Eur J Histochem.* 2017;61(1):36–43.
109. Racetin A, Jurić M, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Durdov MG, et al. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. *Croat Med J.* 2019;60(6):521–31.
110. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Bocina I, Durdov MG, Vukojevic K, et al. Connexin signaling in the juxtaglomerular apparatus (Jga) of developing, postnatal healthy and nephrotic human kidneys. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):1–17.
111. Lozić, Mirela; Filipović, Natalija; Jurić, Marija; Kosović, Ivona; Benzon, Benjamin; Šolić, Ivana; Kelam, Nela; Racetin, Anita; Watanabe, Koichiro; Katsuyama, Yu; Ogata, Masaki; Saraga-Babić, Mirna; Vukojević K. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and Renin Expression Patterns in Postnatal Kidneys of *Dab1*<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. *Int J Mol Sci.* 2021;1–18.
112. Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol.* 1997;7(9):713–6.
113. Cogliati B, Mennecier G, Willebrords J, Da Silva TC, Maes M, Pereira IVA, et al. Connexins, Pannexins, and Their Channels in Fibroproliferative Diseases. *J Membr Biol.* 2016;249(3):199–213.
114. Cooreman A, Campenhout R Van, Yanguas SC, Gijbels E, Leroy K, Pieters A, et al.

- Cholestasis Differentially Affects Liver Connexins. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):1–18.
115. Sorgen PL, Trease AJ, Spagnol G, Delmar M, Nielsen MS. Protein–protein interactions with connexin 43: Regulation and function. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5).
  116. Batissoco AC, Salazar-Silva R, Oiticica J, Bento RF, Mingroni-Netto RC, Haddad LA. A cell junctional protein network associated with connexin-26. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
  117. Vinken M, Decrock E, De Vuyst E, De Bock M, Vandenbroucke RE, De Geest BG, et al. Connexin32 hemichannels contribute to the apoptotic-to-necrotic transition during Fas-mediated hepatocyte cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(6):907–18.
  118. Taruno A. ATP release channels. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).
  119. Saito T, Barbin A, Omori Y, Yamasaki H. Connexin 37 mutations in rat hepatic angiosarcomas induced by vinyl chloride. *Cancer Res.* 1997;57(3):375–7.
  120. Willecke K, Heynkes R, Dahl E, Stutenkemper R, Hennemann H, Jungbluth S, et al. Mouse connexin37: Cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung. *J Cell Biol.* 1991;114(5):1049–57.
  121. Munger SJ, Kanady JD, Simon AM. Absence of venous valves in mice lacking Connexin37. *Dev Biol [Internet].* 2013;373(2):338–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.032>
  122. Simon AM, McWhorter AR. Role of connexin37 and connexin40 in vascular development. *Cell Commun Adhes.* 2003;10(4–6):379–85.
  123. Simon AM, McWhorter AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol.* 2002;251(2):206–20.
  124. Stephanie J. Mungera, Xin Gengb, R. Sathish Srinivasanb MHW, Pauld DL, Simona and AM. Segregated Foxc2, NFATc1 and Connexin expression at normal developing venous valves, and Connexin-specific differences in the valve phenotypes of Cx37, Cx43, and Cx47 knockout mice. *Dev Biol.* 2016;412(2):173–90.
  125. Kanady JD, Dellinger MT, Munger SJ, Witte MH, Simon AM. Connexin37 and Connexin43 deficiencies in mice disrupt lymphatic valve development and result in lymphatic disorders including lymphedema and chylothorax. *Dev Biol [Internet].*

- 2011;354(2):253–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.04.004>
126. Shiojiri N, Niwa T, Sugiyama Y, Koike T. Preferential expression of connexin37 and connexin40 in the endothelium of the portal veins during mouse liver development. *Cell Tissue Res.* 2006;324(3):547–52.
  127. Pei H, Zhai C, Li H, Yan F, Qin J, Yuan H, et al. Connexin 32 and connexin 43 are involved in lineage restriction of hepatic progenitor cells to hepatocytes. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–11.
  128. Desplantez T, Grikscheit K, Thomas NM, Peters NS, Severs NJ, Dupont E. Relating specific connexin co-expression ratio to connexon composition and gap junction function. *J Mol Cell Cardiol [Internet].* 2015;89:195–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.11.008>
  129. Alcoléa S, Théveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, et al. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res.* 1999;84(12):1365–79.
  130. Rackauskas M, Kreuzberg MM, Pranevicius M, Willecke K, Verselis VK, Bukauskas FF. Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45. *Biophys J [Internet].* 2007;92(6):1952–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.099358>
  131. Kroemer, Guido; Susin, Santos A.; Lorenzo, Hans K.; Zamzami, Naoufal; Marzo, Isabel; Snow, Bryan E.; Brothers, Greg M.; Mangion, Joan; Jacotot, Etienne; Costantini, Paola; Loeffler, Markus; Larochette, Nathanael; Goodlett, David R.; Aebersold, Ruedi; Side JM. Susin\_AIF\_1999. *Nature.* 1999;397:441–6.
  132. Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, et al. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(3):1281–6.
  133. Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y, et al. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. Vol. 8, *Cells.* 2019. 1–36 p.
  134. Gao Z, Chen X, Zhu K, Zeng P, Ding G. Dab1 contributes to Angiotensin II-induced apoptosis via p38 signaling pathway in podocytes. *Biomed Res Int.* 2017;2017.



135. Sturm L, Roth L, Zoldan K, Schultheiss M, Boettler T, Huber JP, et al. Blood reelin in the progression of chronic liver disease. *Adv Med Sci* [Internet]. 2021;66(1):148–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2021.01.006>
136. Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Front Oncol*. 2018;8(SEP).
137. Luo Y, Huang K, Zheng J, Zhang J, Zhang L. TGF- $\beta$ 1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma by suppressing reelin expression. *Gene* [Internet]. 2019;688:19–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.033>
138. Yuan Y, Chen H, Ma G, Cao X, Liu Z. Reelin is involved in transforming growth factor- $\beta$ 1-induced cell migration in esophageal carcinoma cells. *PLoS One*. 2012;7(2).
139. Wang W, Feng Y, Aimaiti Y, Jin X, Mao X, Li D. TGF $\beta$  signaling controls intrahepatic bile duct development may through regulating the Jagged1-Notch-Sox9 signaling axis. *J Cell Physiol*. 2018;233(8):5780–91.

# ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Vlatka Paštar

Kontakt: vlatka.pastar@medils.hr; vlatka.matkovic.sb@gmail.com

Datum rođenja: 18.3.1992.

## **Radno iskustvo:**

2018 – PhD student na Mediteranskom institutu za istraživanje života (MedILS)

01/2019 – 03/2019 – MedILS u suradnji s Leiden University Medical Centre (LUMC) pod vodstvom prof. Miroslava Radmana i prof. Niels de Winda, Leiden, Nizozemska

11/2016 – 11 /2017 – Nastavnica biologije i kemije, Osnovna škola Ante Starčević Dicmo, Dicmo, Hrvatska

2016 – 2017 – Stručno osposobljavanje, Osnovna škola Ivana Lovrića, Sinj, Hrvatska

10/2015 – 02/2016 – Stručno usavršavanje na West Pomeranian University of Technology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Szczecin, Poljska

06/2013 – 07/2015 – Student asistent na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru, Mostar, Bosna i Hercegovina

## **Obrazovanje:**

2018/2019 – student na poslijediplomskom doktorskom studiju Biologija novotvorina na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska

2013 – 2015 Magistra biologije i kemije, Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru, Mostar, Bosna i Hercegovina

2010 – 2013 Prvostupnik biologije i kemije, Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru, Mostar, Bosna i Hercegovina

2006 – 2010 Srednjoškolsko obrazovanje, Gimnazija fra Dominika Mandića, Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

## **Nagrade i kvalifikacije**

2018 – Rad s opasnim kemikalijama, Hrvatski zavod za toksikologiju i antidoping

2018 – Profesor biologije i kemije, stručni ispit u Osnovnoj školi Sućidar, Split, Hrvatska

2014 – Rektorova nagrada za najboljeg studenta u akademskoj 2013./2014., Sveučilište u Mostaru, Bosna i Hercegovina

## Tehnike

Western blot, dizajn prajmera, PCR, rad sa stanicama, transfekcija, imunocitokemija, imunohistokemija i imunofluorescencija, svjetlosna i fluorescencijska mikroskopija, Crispr/Cas, DNA ekstrakcija i purifikacija, bakterijska transformacija, elektroforeza na agaroznom gelu, rad s rekombinantnim proteinima

## Konferencije i seminari

2019 Advances in Biomedical Research III, Mediteranski institut za istraživanje života (MedILS), Split, Hrvatska

2018 First Autumn School on Proteostasis from molecular mechanism to organismal consequences, MedILS, Split, Hrvatska

2018 4th Congress of Croatian Geneticists with international participation, Krk, Hrvatska

2018 The ecobiology summit, MedILS, Split, Hrvatska

## Projekti

2021 – Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta (CAKUT) tijekom razvoja u miša i čovjeka

2018 – 2020            Detekcija mutacija u ljudskim stanicama

2020                    Biological activity of *Helycrisum italicum* and *Salvia officinalis* essential oils (suradnik) Glumac, M., Jažo, Z., **Paštar, V.**, Carev, I. Crossroads in Life Sciences, Lovran, Book of Abstracts str.76

2015                    Učinak teških metala na vrstu *Polycelis felina* DALYEL, 1814. (Master student) Knezović, L., **Matković, V.**, Kalafatić, M., Rajević, N., Džeba, B. (2015) Učinak teških metala na vrstu *Polycelis felina* DALYEL, 1814. U: Pilić, Z., Škobić, D. *Proceedings: 2nd scientific and expert conference with international participation, Karst Water and Management and Protection*. Mostar: FPMOZ Sveučilišta u Mostaru, str. 119-128.

## Publikacije

- **Paštar, V.**; Lozić, M.; Kelam, N.; Filipović, N.; Bernard, B.; Katsuyama, Y.; Vukojević, K. Connexin Expression Is Altered in Liver Development of Yotari (*dab1* <sup>-/-</sup>) Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 221, 712. <https://doi.org/10.3390/ijms221910712>