

# Imunohistokemijski izražaj vezajućih proteina Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 i Dab2ip tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja bubrega u yotari miševa

---

Žužul, Sani

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:629778>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



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

**SANI ŽUŽUL, dr. med.**

**IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ VEZAJUĆIH PROTEINA  
MEGALIN, CUBILIN, CAVEOLIN-1, GIPC1 I DAB2IP TIJEKOM  
EMBRIONALNOG I POSTNATALNOG RAZVOJA BUBREGA U  
YOTARI MIŠEVA**

**Doktorski rad**

**Mentorica: Prof. dr. sc. biomed. Katarina Vukojević, dr. med.**

**u Splitu 2024.**

Doktorska disertacija se temelji na objavljenom znanstvenom članku:

Žužul, S., Kelam, N., Racetin, A., Kovačević, P., Konjevoda, S., Filipović, N., Pavlović, N., Vukojević, K. Immunoexpression Patterns of Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 and Dab2IP in the Embryonic and Postnatal Development of the Kidneys in Yotari (Dab1<sup>-/-</sup>) Mice. *Biomedicines*. 2024 Jul 11;12(7):1542. doi: 10.3390/biomedicines12071542. PMID: 39062115; PMCID: PMC11274389.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu pod mentorstvom voditeljice prof. dr.  
sc. biomed. Katarine Vukojević, dr. med.

“Snovi se ostvaruju, ali ne bez pomoći drugih, dobrog obrazovanja, jake radne etike i hrabrosti da se oslonite na njih.” Ursula Burn, CEO Xerox

Hvala najveća čudotvornim molitvama brata Ante i divnome Božjem putu na koji je poslao jedinstvenu osobu koja svojim ohrabrujućim pogledom, toplim osmijehom, srdačnošću, jednostavnošću, iznimnom inteligencijom, znanjem, sposobnošću, mudrošću i prednošću radu može učiniti sve, pa i ostvarenje mogla. Riječ je o mentorici, vrsnoj znanstvenici prof. dr. sc. Katarini Vukojević, kojoj se neizmjereno zahvaljujem.

Također, hvala velika prof. dr. sc. Jošku Božiću te dr. sc. Neli Kelam na velikodušnoj i uvijek prisutnoj pomoći.

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	1
1.1.	<i>Yotari</i> miševi i CAKUT	2
1.2.	Signalni proteini	4
<b>2.</b>	<b>CILJ RADA I HIPOTEZA</b> .....	14
<b>3.</b>	<b>METODE I MATERIJALI</b> .....	16
3.1.	Ispitanici .....	17
3.2.	Postupci .....	17
3.2.1.	Statistička raščlamba .....	19
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	20
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	40
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	46
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	48
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK</b> .....	68
<b>9.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	70
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	72
<b>11.</b>	<b>DODATAK</b> .....	78

## **POPIS OZNAKA I KRATICA**

**ABBA** - *eng.* antibrush border antibody

**AKI** - *eng.* acute kidney injury

**AMN** - *eng.* amnionless

**APP** - *eng.* amyloid- $\beta$  precursor protein

**ARH** - *eng.* autosomal recessive hypercholesterolemia

**CAKUT** - *eng.* congenital anomalies of the kidney and urinary tract

**Cav-1** - Caveolin-1

**Cerebellum** - *lat.* mali mozak

**CIC-5** - kloridni kanal pet (*eng.* chloride channel 5)

**CKD** - *eng.* chronic kidney disease

**DAB1**- intracelularni adapterski protein (*eng.* disabled 1)

**DAB2IP** - *eng.* disabled homolog 2-interacting protein

**DKD** - *eng.* diabetic kidney disease

**EGF** - *eng.* epidermal growth factor

**GIPC1** - *eng.* GAIP interacting protein C-terminus 1

**GPCR** - *eng.* G protein-coupled receptor

**IGF-1R** - *eng.* insulin-like growth factor-1 receptor

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

**PTB** - *eng.* phosphotyrosine binding

**PTECs** - *eng.* proximal tubular epithelial cells

**RAP** - *eng.* receptor associated protein

**RCC** - *eng.* renal cell carcinoma

**ROMK** - *eng.* renal outer medullary potassium

**TGF- $\beta$**  - *eng.* transforming growth factor beta

**VEGFR** - *eng.* vascular endothelial growth factor

*Yot - Yotari miš*



## **1. UVOD**

## 1.1. *Yotari* miševi i CAKUT

Miševi *Yotari* dobiveni su spontanom mutacijom u genu *Dab1* i pokazuju abnormalnosti u središnjem živčanom sustavu (1,2,3). Stoga, riječ je o neurološki mutiranom mišu čija se mutacija prenosi na autosomno recesivan način. Prepoznatljivi su po nestabilnom hodanju, tremoru i ranoj smrti, otprilike u vrijeme odvikavanja od dojenja. Cerebellum *yotarija* je hipoplastičan i nema folijacije. Može se uočiti zrnati i molekularni dio stanica, točnije vanjski i unutrašnji sloj, ali Purkinjeove stanice su raspršene po bijeloj tvari te zrnatom sloju. Laminarna struktura cerebralnog korteksa i hipokampalne formacije su iskrivljene (2). Odrasli glodavci podižu se za rep i polako spuštaju prema vodoravnoj površini, pri tome pružaju sva četiri uda očekujući kontakt. Mišji mutant umjesto toga pokazuje reakciju savijanja, često karakteriziranu stiskanjem šape i držanjem poput šišmiša (4). Homozigotni *Dab1<sup>scm</sup>* miševi nakon rođenja imaju tjelesni tremor, anomalije hoda i manju tjelesnu težinu. Petnaestog postnatalnog dana deficiti motoričke koordinacije bili su vidljivi na testovima vodoravne i okomite rešetke u kombinaciji sa slabijom snagom stiska. Slično, mutanti su se razlikovali od kontrola na testovima ispravljanja i stezanja stražnje šape. Daljnje razlike otkrivene su postnatalnog dvadeset i drugog dana u obliku slabijeg vizualnog postavljanja, izbjegavanja dodira, savijanja trupa, smrzavanja, smanjenog odgovora na vokalizaciju, kao i prijedene kvadratiće na otvorenome. Procjena u odrasloj dobi pokazala je slična oštećenja, što ukazuje na trajne motoričke promjene (5).

DAB1 je intracelularni adapterski protein. Važan je za put prijenosa signala koji koordinira formiranje neuronskih mreža i pozicioniranje neurona u mozgu tijekom razvoja (6). Također, aktiviran DAB1 potiče stanične procese koji su bitni za razvojne aktivnosti stanica (7). Mutacije u genu DAB1 mogu potaknuti kliničku prezentaciju spinocerebelarne ataksije (8) i uvjetovati Alzheimerovu bolest (9). DAB1 je povezan s neurorazvojnim poremećajima, uključujući shizofreniju i poremećaje iz spektra autizma u mnogim genetskim, životinjskim, kao i postmortalnim studijama (10).

Uočeno je kako je DAB1 smanjen u tkivima primarnog tumora, osobito kod raka mozga i endometrija (11,12). Ustanovljeno je da kod karcinoma dojke umanjenje DAB1 pridonosi trostruko negativnom fenotipu raka dojke, slabijoj diferencijaciji i metastazama u limfnim čvorovima (13). S povećanim izražajem DAB1 inaktivira stanično sjedinjavanje, migraciju i kolonizaciju stanica raka prostate (11).

Povezanost *Dab1* proteina s Reelin signalnim putem smatra se jednim od važnijih molekularnih puteva povezanih s migracijom kortikalnih neurona tijekom procesa neurogeneze. Izvanstanični Reelin veže lipoproteinske receptore iz obitelji LDLR te se internalizira. Internalizacija kompleksa Reelin-lipoprotein receptora u endocitne vezikule rezultira povećanom tirozinskom fosforilacijom

Dab1 regrutiranjem neidentificirane kinaze i povećanim prometom Dab1. Dab1 se također povezuje s drugim transmembranskim proteinima. Reelinom inducirana modifikacija Dab1 fosforilacije može predstavljati kritičan korak u prijenosu Reelin signala iz izvanstaničnog okoliša u unutarstanične događaje, kao što je aktivacija drugog glasnika i promijenjena ekspresija gena (14).

DAB1 je izraženo zastupljen u mišjim podocitima, kao i u bubrezima ljudskog fetusa (15,16). Novija istraživanja su otkrila da *yotari* miševi imaju nepotpun razvoj bubrega, poremećaj u spektru kongenitalnih anomalija bubrega i urinarnog trakta (CAKUT). Nadalje, *yot* miševi imaju izravnanje nastavaka stanica podocita u glomerulima, što može utjecati na gubitak funkcije bubrega i posljedično preranu smrt (1,17,18).

CAKUT se javlja u 3 - 6 na 1 000 živorođene djece, te čini većinu slučajeva završnog stadija bubrežne bolesti kod djece i stvara predispoziciju za hipertenziju i kardiovaskularne bolesti tijekom života (19). Uvjetuju 34 – 59 % kroničnih bubrežnih bolesti (*eng.* CKD) (19). Predstavlja širok raspon poremećaja koji su posljedica razvojnih abnormalnosti donjeg urinarnog trakta, urinarnog sabirnog sustava, pogrešne embrionalne migracije bubrega ili abnormalnog razvoja bubrežnog parenhima (20). Anomalije donjeg dijela mokraćnog sustava identificiraju se u oko 50 % oboljelih pacijenata i uključuju vezikoureteralni refluks (25 %), opstrukciju ureteropelvičnog spoja (11 %) i opstrukciju ureterovezikalnog spoja (11 %) (21,22). Malformacije bubrega obično se identificiraju u prenatalnom razdoblju i čine 20-30 % svih detektabilnih anomalija (22,23,24).

**Tablica 1.** Fenotipska podjela CAKUT-a (20)

Aplazija bubrega
Bubrežna displazija
Bubrežna hipoplazija
Dvostruki bubreg
Potkovasti bubreg
Opstrukcija ureteropelvičnog spoja
Duplikacija uretera
Vezikoureteralni refluks

Patogeneza CAKUT-a nije dobro definirana. Fenotipska heterogenost CAKUT-a može proizaći iz sljedećih mehanizama: mutacije u jednom ili više gena povezanih s ljudskim CAKUT-om, genetski ili epigenetski modifikatori, način nasljeđivanja i okoliš (19). Podatci pokazuju da otprilike 20 % pacijenata može imati genetski poremećaj koji se obično ne otkriva standardnim kliničkim procjenama, što implicira mnoge različite mutacijske mehanizme i patološke molekularne putove (25). Međutim, autosomno dominantni i autosomno recesivni defekti jednog gena, poligeno nasljeđe i veliki citogenetski defekti (tj. varijacije broja kopija) povezani su s CAKUT-om (26,27).

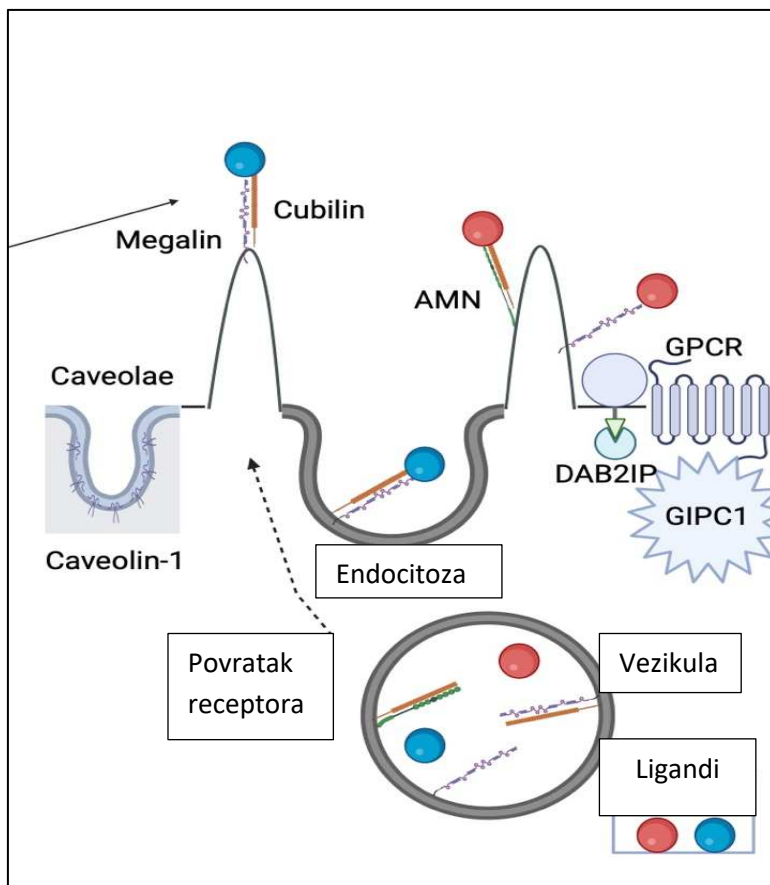
Iako se mnogi oblici CAKUT-a javljaju u kontekstu sindroma multiorganske malformacije, većina slučajeva CAKUT-a je nesindromska (28).

Većina slučajeva CAKUT-a dijagnosticira se prenatalnim ultrazvučnim snimanjem, kojim se pregledavaju bubrezi, mokraćni putevi i volumen amnionske tekućine. Prenatalni ultrazvuk ispravno dijagnosticira poremećaje bubrega/mokraćnih puteva u oko 85 % dojenčadi, osobito ako se snimanje izvodi u zadnjem tromjesečju (29). Preostali slučajevi CAKUT-a uglavnom se dijagnosticiraju nakon što se dojenče ili dijete pojavi s infekcijom mokraćnog sustava, što zahtijeva ultrazvuk i/ili druge slikovne studije za pregled bubrega i mokraćnih puteva. Pojedinci rođeni s jednim ili dva bubrega, ali niskim brojem nefrona, možda neće pokazivati nikakve znakove ili simptome sve do adolescencije ili odrasle dobi kada se može dijagnosticirati rana hipertenzija i/ili CKD (30).

Razumijevanjem uzroka CAKUT-a mogu se započeti preventivni postupci i uspostaviti kliničke smjernice o tome kako treba liječiti, odnosno pratiti ove pacijente.

## 1.2. Signalni proteini

Postoji mnogo različitih proteina koji prenose signalne informacije do stanica. Djelovanje je preko liganda koji se vežu na receptore izražene na ciljnim stanicama. Takvi membranski proteini predstavljaju više od 30 % ljudskog proteoma i sudjeluju u bitnim biološkim procesima, kao što su stanična signalizacija, transport i prepoznavanje stanica. Defekti u prometu izlučenih ili membranskih proteina doprinose patogenezi mnogih ljudskih bolesti (31). U ovoj doktorskoj disertaciji cilj je bio istražiti neke od tih signalnih markera tijekom razvoja bubrega i njihovu potencijalnu funkciju u patologiji bubrega.



**Slika 1.** Megalin, Cubilin, Caveolin-1, GIPC1 i DAB2IP su receptori liganada u strukturama bubrega. U proksimalnim tubularnim epitelnim stanicama, Megalin sa svojim citoplazmatskim repom daje signal za endocitozu posredovanu klatrinom. Cubilin se mora pridružiti Megalinu ili AMN za uspješno signaliziranje. Nakon preuzimanja, ligandi se oslobađaju u vezikulama i prenose u druge strukture stanice dok se receptori vraćaju na apikalnu membranu (32). Caveolin-1 je glavna struktura kaveola u plazma membrani koja je ključna za stanični metabolizam, a posljedično i za bubrežne bolesti (33). GIPC1 stupa u interakciju s mnogo transmembranskih receptora (na primjer GPCR) za međustaničnu signalizaciju (34). DAB2IP je signalni adaptor koji se veže s upalnim citokinima i faktorima rasta (35). Izrađeno s BioRender.com.

## Megalin

Megalin je multifunkcionalni endocitni receptor koji pripada obitelji receptora lipoproteina niske gustoće. Veže niz strukturno vrlo različitih proteina. Megalin je izvorno identificiran kao antigen u Heymannovom nefritisu, štakorskom modelu membranoznog glomerulonefritisa (36). Najviše se nalazi u četkastom rubu proksimalnih tubula bubrega (*eng.* PTECs) i luminalnom endocitnom aparatu (36,37,38,39), kao i u lizosomskim strukturama u manjim količinama. Također, identificiran je u glomerularnim podocitima Lewis štakora (40). Ekstrarenalna ekspresija Megalina uključuje niz

drugih apsorpcijskih epitela (poput ileuma, žumanjčane vreće glodavaca) te se nalazi u mozgu, plućima, posteljici i štitnjači (41). Sadrži veliku amino-terminalnu izvanstaničnu domenu, jednu transmembransku domenu i kratki karboksi-terminalni citoplazmatski rep. Potonji sadrži dvije NPXY sekvence koje posreduju u vezivanju na adaptorske proteine i grupiranju u jamice obložene klatrinom, uz nekoliko mjesta prepoznavanja Src homologije 3 i jedne Src homologije 2. Izvanstanična domena sastavljena je od četiri cisteinom bogate skupine ponavljanja receptora lipoproteina niske gustoće tipa A koji čine regije vezanja liganda odvojene i nakon kojih slijedi ukupno 17 ponavljanja tipa epidermalnog faktora rasta (*eng.* EGF) i osam razmaknutih regija koje sadrže YWTD ponavljanja. Općenito, vezanje na Megalin ovisi o  $Ca^{2+}$ , a sam Megalin vrlo snažno veže kalcij (42).

Mehanizam endocitoze je sustav koji je neophodan za staničnu signalizaciju i preživljavanje. Smatra se da je to jednostavan mehanizam pomoću kojeg stanice unose hranjive i druge tvari (43,44). Reapsorpcija i metabolizam proteina u glomerularnim filtratima ovisi o endocitozi posredovanoj receptorima u PTEC. Proteinurija je klinički marker bolesti bubrega i srca. Kod bolesti bubrega, osim abnormalne glomerularne propusnosti, proteinurija se također razvija kada su endocitozni mehanizmi patološki izmijenjeni. Endocitoza koju posreduju receptori zahtijeva koordinaciju nekoliko proteina i molekula prijenosa signala (45). Megalin ima ključnu ulogu u endocitozi različitih liganda filtriranih kroz glomerul ili PTEC-om (46). Megalin reapsorbira važne tvari, poput vitamina D, vitamina A i B12 (47) te proteina koji veže retinol (48). Također, reapsorbira nefrotoksične tvari, poput antimikrobnih ili lijekova protiv raka, kao što je gentamicin (49), vankomicin (50) i cisplatin (51). Ključan je u reapsorpciji proteina i peptida koji se odnose na sustav renin-angiotenzin (52), albumina obogaćenih masnim kiselinama, kao i krajnjeg proizvoda glikacije (53). Velik dio našeg znanja o funkcijama Megalina temelji se na podacima dobivenim proučavanjem miševa s nedostatkom Megalina (54,55). Stanice proksimalnih tubula bez Megalina karakterizirane su gubitkom endocitnih invaginacija, vezikula i odjeljka za recikliranje membrane, gustim apikalnim tubulima (56) te povećanom količinom niskomolekularnih serumskih proteina (42). Normalna ekspresija Megalina ovisi o proteinu povezanom s receptorom (*eng.* RAP) koji štiti novosintetizirani receptor od ranog vezanja liganada (57). Brojne bolesti karakterizirane proteinurijom otkrivaju smanjenu bubrežnu ekspresiju Megalina (42). Mutacija gena koji kodira CIC-5 uzrokuje poremećaj proksimalnih tubula poznat kao Dentova bolest, koju karakterizira, osim proteinurija niske molekularne težine, još hiperkalciurija, nefrolitijaza, aminoacidurija, fosfaturija i zatajenje bubrega (58). Mutacije gena koji kodira Megalin uzrokuje Donnai–Barrowov sindrom (DBS), točnije facio-okulo-akustično-renalni sindrom, koji je autosomno recesivni poremećaj karakteriziran višestrukim abnormalnostima uključujući malformaciju prednjeg mozga i očiju, kao i defekt reapsorpcije u PTEC-ima (59). Postoji serija slučajeva bolesti koju karakteriziraju protutijela protiv četkastog ruba i posljedično zatajenje

bubrega (ABBA bolest). Bolesnici s ABBA bolešću imaju subnefrotsku proteinuriju, razvijaju akutnu ozljedu bubrega i pokazuju oštećenje proksimalnih tubula s naslagama IgG u apikalnim i tubularnim bazalnim membranama u proksimalnim tubulima. Imunološko bojenje otkrilo je da se Megalin specifično kolonizira s IgG u tubularnim imunološkim naslagama (60). Razumijevanje fiziologije i signalizacije Megalina iskorišteno je kao cilj za ublažavanje nekih bolesti bubrega (32). Osim toga, ligandi Megalina korišteni su kao sustav za isporuku lijeka s vrsnom učinkovitosti (61).

## **Cubilin**

Cubilin je multiligand, endocitni receptor također poznat kao intestinalni intrinzični faktor (IF)-B12 receptor (62). Izvorno je identificiran kao meta teratogenih protutijela kod štakora (42). Visoko je izražen u PTEC i endocitnom aparatu (62,63). Također se može identificirati u lizosomima. Normalna ekspresija Cubilina ovisi o transmembranskom proteinu bez amniona (*eng.* AMN), ~45 kDa identificiran kao važan čimbenik za normalan razvoj srednjeg dijela primitivne pruge kod miševa (64). Ukoliko AMN nije prisutan, Cubilin se zadržava u unutarstaničnim strukturama (32). Mutacije u genu Cubilin ili AMN identificirane su u Imerslund-Gräsbeckovoj bolesti (65,66). Riječ je o nasljednome sindromu nedostatka vitamina B12 karakteriziran neispravnom intestinalnom apsorpcijom IF-B12 (67,68). Cubilin, zajedno s Megalinom, izražen je u apikalnim endocitnim odjeljcima proksimalnog tubula (62), a također se nalazi u podocitima štakora i ljudi (69). Cubilin je izvanstanični protein i stupa u interakciju s drugim membranskim proteinima radi endocitoze. Tako u proksimalnom tubulu se spaja s Megalinom, tvoreći multireceptorski kompleks koji pokreće internalizaciju vezanih liganada (70,71,72). Dosadašnje studije o cjelokupnom genomu povezale su varijacije unutar gena za Cubilin s razvojem završne faze bubrežne bolesti i rizikom razvoja albuminurije (74,75).

**Tablica 2.** Tablica liganda za Cubilin (73)

<b>Proteini nosači vitamina</b>
Intrizični faktor vitamina B12
Vitamin D-vežući protein
<b>Ostali proteini nosači</b>
Albumin
Mioglobin
Hemoglobin
Transferin
Lipoproteini
Apolipoprotein A-I
Lipoprotein visoke gustoće
<b>Hormoni i signalni proteini</b>
Fibroblast faktor rasta
<b>Enzimi i inhibitori enzima</b>
Rekombinantni aktivirani faktor VIIa
<b>Proteini povezani s imunitetom i stresom</b>
Ig laki lanci
Sekretorni protein Klara stanica
$\alpha$ 1-Mikroglobulin
<b>Lijekovi i toksini</b>



Aminoglikozidi
<b>Receptori</b>
Megalin
<b>Ostali</b>
Protein povezan s receptorom
Faktor koagulacije VII

## Caveolin-1

Caveolin-1 (Cav-1) je identificiran 1989. kao prvi član obitelji caveolinskih proteina. Izoliran je protein citoskeleta od 22 kDa iz pilećih fibroblasta transformiranih virusom Rousovog sarkoma, koji je bio supstrat za fosforilaciju tirozina (76). CAV1 se nalazi na ljudskom kromosomu 7q31.1 (77). Cav-1 postoji u dva izoforma ( $\alpha$  i  $\beta$ ), a svaki monomer ima ukosnu konformaciju sposobnu za dimerizaciju (78,79). Protein Cav-1 sastoji se od četiri domene: N-terminalne, domene oligomerizacije, intramembranske i C-terminalne domene (80,81,82). Ekspresija Cav-1 regulirana je na tri načina: genomskom epigenetičkom modifikacijom, transkripcijom i posttranskripcijskim regulacijskim mehanizmima (33). Važna fiziološka funkcija Cav-1 je da djeluje kao središnja komponenta caveola i sudjeluje u njezinoj biogenezi. Caveole se sastoje od posebne membranske invaginacije na lipidnom sloju i nalaze se u plazma membrani mnogih stanica sisavaca (83).

Cav-1 regulira različite aktivnosti enzima ili ekspresiju receptora i usmjerava ih na stanične membrane. Utvrđeno je da povećana ekspresija Cav-1 djeluje na glikolitičke enzime (kao što su fosfofruktokinaza i aldolaza) te receptore povezane sa živčanim sustavom (npr. receptor eurotrofina i nukleotidni receptor P2Y2) premještajući ih u staničnu membranu, potom posredujući u transdukciji signalne molekule, što na kraju utječe na stanični metabolizam (33). Caveolin-1 također posreduje u endocitozi nekih virusa, enzima, makromolekularnih tvari i receptora. Nakon koekspresiranosti s Cav-1 i transendocitoze, dolazi do upale, fibroze i prijenosa signala, djelujući na stanični metabolizam (84), rast i starenje (85). Štoviše, Cav-1 također regulira transdukciju signala T i B-staničnog antigenskog receptora utječući na urođeni upalni imunološki odgovor (86). Cav-1 negativno regulira membranske receptore obitelji tirozin kinaze, što posljedično modulira staničnu proliferaciju i metastaze (87,88). Također je dokazano da regulira funkciju mitohondrija i metabolizam stanične

energije (89,90,91). Trenutno je poznato da je Cav-1 uključen u regulaciju metabolizma glukoze, što ukazuje da ima ključnu ulogu u unosu glukoze u bubrežnim tubulima (92,93). Sudjelovanje u regulaciji autofagije je također funkcija Cav-1. Može se vezati na kompleks proteina povezani s autofagijom u epitelnim stanicama te inhibirati stvaranje i funkciju autofagosoma (94). Bliski odnos između Cav-1 i autofagije ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida (95). Oksidativni stres ključni je čimbenik u staničnom metabolizmu. Dokazano je da Cav-1 regulira oksidativni stres i sudjeluje u procesu staničnog života (96). Cav-1 je uključen i u patofiziologiju akutne ozljede bubrega (*eng.* AKI). Istraživanje je potvrdilo da je ekspresija Cav-1 povećana kod miševa AKI izazvanih ishemijom ± reperfuzijom i potvrdili da je uništenje kaveola kod oštećenih epitelnih stanica bubrežnih tubula uzrokovalo odvajanje kolesterola i Cav-1 od plazma membrane. Posljedično je došlo do oslobađanja naslaga kolesterola u lumenu bubrežnih tubula i povećanu razinu Cav-1 u urinu (97). Ima antifibrotička svojstva reguliranjem stanične proliferacije, migracije i adhezije, kao i inhibicijom TGF- $\beta$  signalnog puta kod dijabetičke bubrežne bolesti (*eng.* DKD) (98,99). Uz to, Cav-1 također može regulirati unos glukoze i posredovati u endocitozi urinarnog albumina, stoga se smatra potencijalnim terapijskim ciljem za DKD (100). Prepoznato je metaboličko reprogramiranje u svijetlostaničnom karcinomu bubrežnih stanica (*eng.* RCC) (101). Zabilježeno je da Cav-1 inhibira matične stanice raka dojke upravo metaboličkim reprogramiranjem (102). Cav-1, koji je značajno povećan u RCC tkivu bubrega, može regulirati rast i metastaze stanica raka (103).

## GIPC1

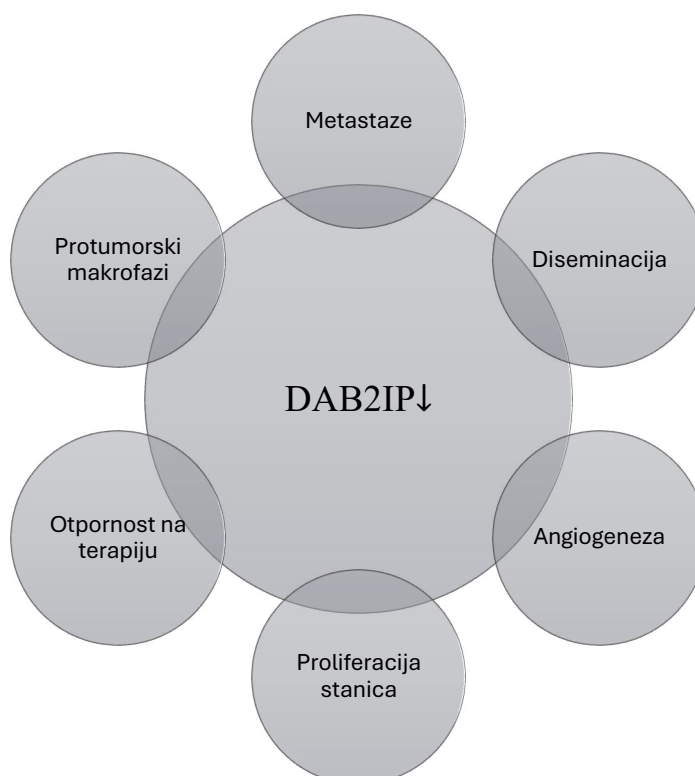
GAIP interakcijski protein C, GIPC/GIPC1, također poznat kao sinektin (104) ključni je član PDZ obitelji (105) koji funkcionira kao esencijalni adaptor za promet membranskih receptora, signalnih endocitnih puteva i proteinskih kompleksa. Kao takav, GIPC1 se smatra vrlo svestranom molekulom koja kontrolira raznolike stanične i patofiziološke procese. Do danas su poznate interakcije s više od 50 proteina, uključujući VEGFR, IGF-1R i GPCR, od kojih mnogi imaju ključnu ulogu u neuronskom i kardiovaskularnom razvoju (34). U posljednjih nekoliko godina GIPC je dobio sve veću pozornost zbog svoje uloge u karcinogenezi. Ne samo da služi kao antigen kod raka dojke i jajnika (106,107), već je snažno upleten u napredovanje brojnih zloćudnih bolesti uključujući gušteraču (108), debelo crijevo (109), kožu (110), karcinom pluća (111) i želudca (112) potenciranjem rasta tumora, invazije, metastaza i preživljavanja stanica. Nasuprot tome, GIPC1 je smanjen kod raka grlića maternice (113), primarnog tumora bubrega, kolorektalnog karcinoma, kao i raka prostate (112) te može promicati tumorske supresivne učinke u takvim okruženjima. Ovi suprotni učinci vjerojatno proizlaze iz različitih signalnih konteksta, vrste liganda te ukupne snage i trajanja njihovih interakcija s GIPC1. Sukladno tome, disregulacija aktivnosti GIPC1, bilo kroz gubitak ili prekomjernu ekspresiju, može

poremetiti višestruke signalne mreže faktora rasta i preživljavanja stanica koje u konačnici pomažu u pokretanju onkogeneze i progresije tumora.

GIPC1 sudjeluje u regulaciji metabolizma jetrenih lipida i kolesterola (114). Također, mutacije GIPC1 se povezuju s bolestima poremećaja kretanja (115).

## DAB2IP

DAB2IP je novi član obitelji Ras GTPaze, uključen u regulaciju stanične proliferacije, apoptoze i metastaza (116). Prvi put je prijavljen 2002. kao gen za kodiranje proteina koji se nalazi na ljudskom kromosomu 9q33.1-q33.3 (117). Također, smatra se tumor supresorskim genom koji je povezan s rakom jajnika (118), prostate (119), dojke (120) te koriokarcinomom (121). Posljednjih je godina sve više studija otkrilo da je DAB2IP značajno smanjen u mnogim vrstama raka, a niska ekspresija DAB2IP u tumorima može predvidjeti lošu prognozu malignih tumora (116,122). Također, dokazano je kako mutacija gena za Dab2IP uvjetuje kronični psihološki stres (123). Velika studija povezanosti ljudskog genoma je otkrila da varijante gena za DAB2IP pridonose razvoju kardiovaskularnih bolesti uključujući aneurizmu abdominalne aorte, perifernu vaskularnu bolest, rani početak infarkta miokarda i plućnu emboliju (35,124). Dokazano je kako Dab2IP ima važnu ulogu u razvoju dendrita i regulira broj sinapsi u malom mozgu (125). Njegova aktivacija pokreće različite biološke reakcije, kao što su upala, diferencijacija, preživljavanje u različitim vrstama stanica (126), angiogeneza (127), migracija te sazrijevanje stanica (128).

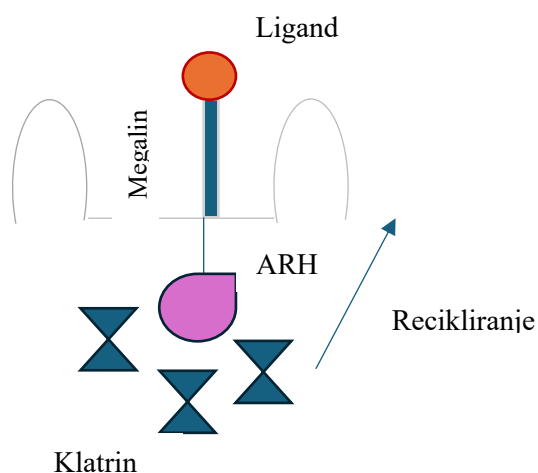


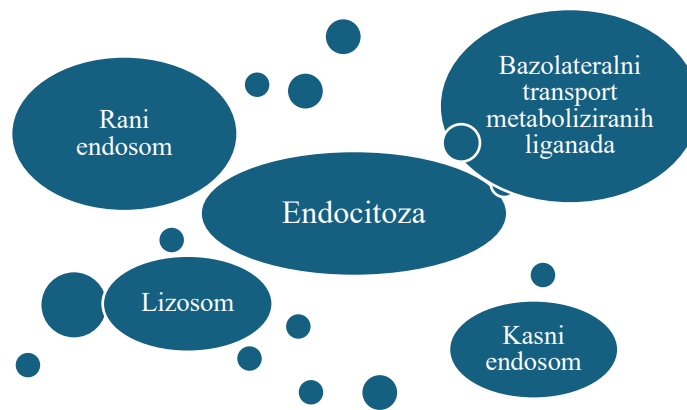
**Slika 2.** Inaktivacija ili smanjena regulacija DAB2IP u stanicama karcinoma. Gubitak DAB2IP u tumorskim stanicama podržava aktivaciju i regrutiranje pro-tumorogenih makrofaga, povećava otpornost na kemoterapiju i radioterapiju, potiče proliferaciju stanica, usporava apoptozu i pridonosi metastatskom širenju. Gubitak DAB2IP u endotelnim stanicama potiče neoangiogenezu i pogoduje metastazama (129).

## ZNANSTVENI DOPRINOS

### ARH

ARH je protein koji veže fosfotirozin (*eng.* PTB) protein (130). Otkriven je kod pacijenata s autosomno recesivnom obiteljskom hiperkolesterolemijom (*eng.* ARH). Pacijenti, koji su homozigoti za defekt, u ovom genu ne uspijevaju internalizirati lipoprotein niske gustoće (*eng.* LDL) u jetri i pokazuju tešku hiperkolesterolemiju i preuranjenu koronarnu bolest srca, što implicira da je ARH potreban za učinkovito preuzimanje LDL-a. U nekim tkivima, kao što su bubrezi i placenta, ARH je jako izražen, a ekspresija LDL-a je relativno niska, što povećava mogućnost da ARH može imati druge partnere vezanja (131). ARH se veže na prvu sekvencu u citoplazmatskom repu Megalina i prati ga kroz njegov intracelularni reciklirajući put od jamica obloženih klatrinom do i kroz rane endosome te na površinu stanice. Također, olakšava transport Megalina kroz endosomalni sustav (132). Površinska ekspresija vanjskog medularnog kalijskog kanala u bubrezima (*eng.* ROMK) kontrolirana je endocitozom ovisnom o klatrinu u distalnom nefronu, ograničavajući izlučivanje kalija u stanjima nedostatka kalija (133). ARH stimulira ROMK endocitozu na način koji je ovisan o internalizacijskom signalu. Endocitoza, ovisna o ARH-u, osigurava mehanizam za regulaciju ROMK-a u skladu sa zahtjevima ravnoteže kalija (134).





**Slika 3.** Endocitoza posredovana ARH-om i Megalinom. Plazma membrane počinje invaginirati i konačno pupa tijekom endocitne internalizacije i doseže rane endosome, gdje se odluka o daljnjoj obradi liganda donosi ovisno o sadržaju tereta. U nedostatku ARH-a Megalin se reciklira natrag u plazma membranu putem ranog puta recikliranja, dok se u prisutnosti ARH-a Megalin reciklira natrag u membranu putem puta kasnog recikliranja. Ovisno o specifičnim interakcijama proteina i procesima razvrstavanja temeljenima na domeni, rani endosomi također mogu biti usmjereni na kasne endosome, koji zatim sazrijevaju u kasni endosomalni odjeljak i formiraju multivezikularna tijela. Kada multivezikularna tjelešca dođu u dodir s plazma membranom, njihov se sadržaj izlučuje u obliku egzosoma. Ligandi mogu biti podvrgnuti lizosomskoj degradaciji, a metabolizirani ligandi tada prolaze kroz bazolateralnu transcitozu (135).

## **2. CILJ RADA I HIPOTEZA**

## **Cilj rada**

Cilj istraživanja je definiranje uzoraka proteinske imunoekspresije Megalina, Cubilina, Caveolina-1, Gipc1 i Dab2IP u razdoblju razvoja (E13.5 i E15.5) i ranom postnatalnom (P4 i P14) razvoju u bubrezima *yotari* (Dab1  $-/-$ ) miševa usporedno s miševima divljeg tipa.

## **Hipoteza**

Proteini Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 i Dab2IP pojavljuju se u razvoju i postnatalno u mišjim bubrezima, a njihova ključna funkcija međusobnog djelovanja značajno doprinosi očuvanju njihove strukture i aktivnosti.

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



### 3.1. Ispitanici

#### Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni *Dab1*<sup>-/-</sup> (*yotari*) miševi kao *Dab1* nulti konvencionalni mutanti razvijeni prema dosadašnjim opisanim postupcima. C57BL/6N miševi su uzgajani i grupno smješteni u standardnim polikarbonatnim kavezima, s 3 – 4 životinje u svakom kavezu, osiguravajući najmanje jednu od svakog genotipa. Imali su stalni pristup hrani i vodi u prostoriji s kontroliranom temperaturom (oko 23° C). Fotoperiod se sastojao od 12 sati umjetne svjetlosti i 12 sati tame. Za genotipizaciju, PCR analizu, korištene su početnice: *yotari* -GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CAGTGAGTACATATTGTGTGAGTTCC, divlji tip -GCCCTTCAGCATCACCATGCT i CCTTGTTTCTTTGCTTTAAGGCTGT. Gravidni miševi su eutanazirani 13.5 i 15.5 dana razvoja, a njihovi embriji su prikupljeni. Ostale skupine miševa žrtvovane su u određenim postnatalnim danima (4. i 14.). Ukupno tri do četiri životinje korištene su za svaku ispitivanu skupinu (broj životinja je određen pomoću Meadove jednadžbe).

### 3.2. Postupci

Miševi su duboko anestetizirani intraperitonealnom injekcijom pentobarbitala kako bi se osiguralo da su potpuno bez svijesti i ne reagiraju na bol. Nakon toga su transkardijalno perfundirani otopinom soli s fosfatnim puferom (PBS, pH 7.2) kako bi se očistila krv iz krvožilnog sustava i dobro fiksirali s 4 % paraformaldehidom (PFA) u 0,1 M PBS-a. Bubrezi su pažljivo ekstrahirani i tretirani s 4 % PFA u 0,1 M PBS-a preko noći kako bi se pripremili za naknadnu histološku procjenu, uključujući hematoksilin-eozin i imunofluorescentno bojenje.

Tkivo je ugrađeno u parafinske blokove nakon završetka fiksacije i dehidracije pomoću stupnjevanih otopina etanola. Sekcije debljine pet mikrona serijski su izrezane i zatim pričvršćene na stakalce. Integritet tkiva je verificiran bojanjem hematoksilin-eozinom svake desete sekcije. Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije u stupnjevanim otopinama voda-etanol, postavljeni uzorci tkiva podvrgnuti su vodenoj pari 30 minuta na 95° C u 0,01 M citratnom puferu (pH 6,0) prije nego su progresivno ohlađeni na sobnu temperaturu. Reagens za blokiranje proteina primijenjen je 20 minuta nakon ispiranja u 0,1 M PBS-a s ciljem sprječavanja nespecifičnog bojanja. Primarna protutijela korištena su na rezovima, nakon čega je uslijedio period inkubacije preko noći u vlažnoj komori. Sljedeći dan su isprani PBS-om, inkubirani jedan sat s odgovarajućim sekundarnim protutijelima. Naposljetku, jezgre su vizualizirane pomoću DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindola) bojenja nakon što su uzorci isprani u PBS-u. Uzorci su osušeni i pokriveni stakalcima. Prije

provođenja predapsorpcijskog testa točno je određena koncentracija svakog primarnog protutijela u otopini za blokiranje. Nakon dodavanja odgovarajućeg peptidnog antigena dobivena smjesa je nanesena u rezove. U rezultatima nije bilo dokaza o bilo kakvom bojanju antitijela. Odsutnost primarnih protutijela u fazi imunofluorescencije nije rezultirala pojavom lažno pozitivnih rezultata ili nespecifičnog vezivanja sekundarnih protutijela. Isječci su analizirani uporabom fotoaparata Nikon DS-Ri2 (Nikon Corporation, Tokio, Japan) u kombinaciji s imunofluorescentnim mikroskopom (BX51, Olympus, Tokio, Japan). Kako bi se kvantificirala imunoekspresija ciljanih proteina, analizirana su konstantna vremena izlaganja dok su vidna polja koja se ne preklapaju snimljena pri povećanju od 40x. Dobiveno je najmanje deset slika koje prikazuju strukture bubrega tijekom embrionalnog razvoja: nezreli glomeruli (g), metanefrogeni mezoderm (mm), bubrežni mjehurići (rv), ampule (A), zavijeni tubuli (Ct) i sabirni kanalići (Cd) u embrionalnim danima (E13.5 i E15.5). Uz to, dobiveno je dvadeset slika bubrežnih struktura tijekom postnatalnog razvoja, uključujući glomerule (g), proksimalno zavijene (pct) i distalno zavijene tubule (dct) u danima P4 i P14. Lotus tetragonolobus lektin (LTL) korišten je kao marker za proksimalne kanaliće, Dolichos biflorus aglutinin (DBA) kao marker za razvoj bubrežnih sabirnih kanalića i distalnih tubula u postnatalnom korteksu bubrega te Aquaporin 2 (AQP2) kao marker za razvijajuće sabirne kanaliće i distalne tubule te sabirne tubule u postnatalnom korteksu bubrega. Adobe Photoshop verzija 21.0.2. i softver ImageJ software verzija 1.530 korišteni su za analizu svake snimljene slike. Određen je broj imunoreaktivnih stanica za Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 i Dab2IP, a dobiveni postotak ukupnih stanica je izračunat za sve skupine životinja. Pozitivni rezultati su uzeti u obzir za bilo koji stupanj bojanja citoplazme, jezgre ili membrane s korištenim markerima. Uzimajući u obzir varijacije među promatračima, snimljene mikrofotografije neovisno su analizirala tri istraživača. Analiza međurazredne korelacije pokazala je međuocjenjivačko slaganje s koeficijentom većim od 0,8, što označava izvanredno slaganje (136).

Četiri stupnja semi-kvantitativne procjene primijenjena su na intenzitete bojanja različitih struktura bubrega: nema reaktivnosti (-), blaga reaktivnost (+), umjerena reaktivnost (++) i jaka reaktivnost (+++). Potonju analizu je proveo histolog koji je pažljivo pregledao rezove s potvrdom podataka.

### 3.2.1. Statistička raščlamba

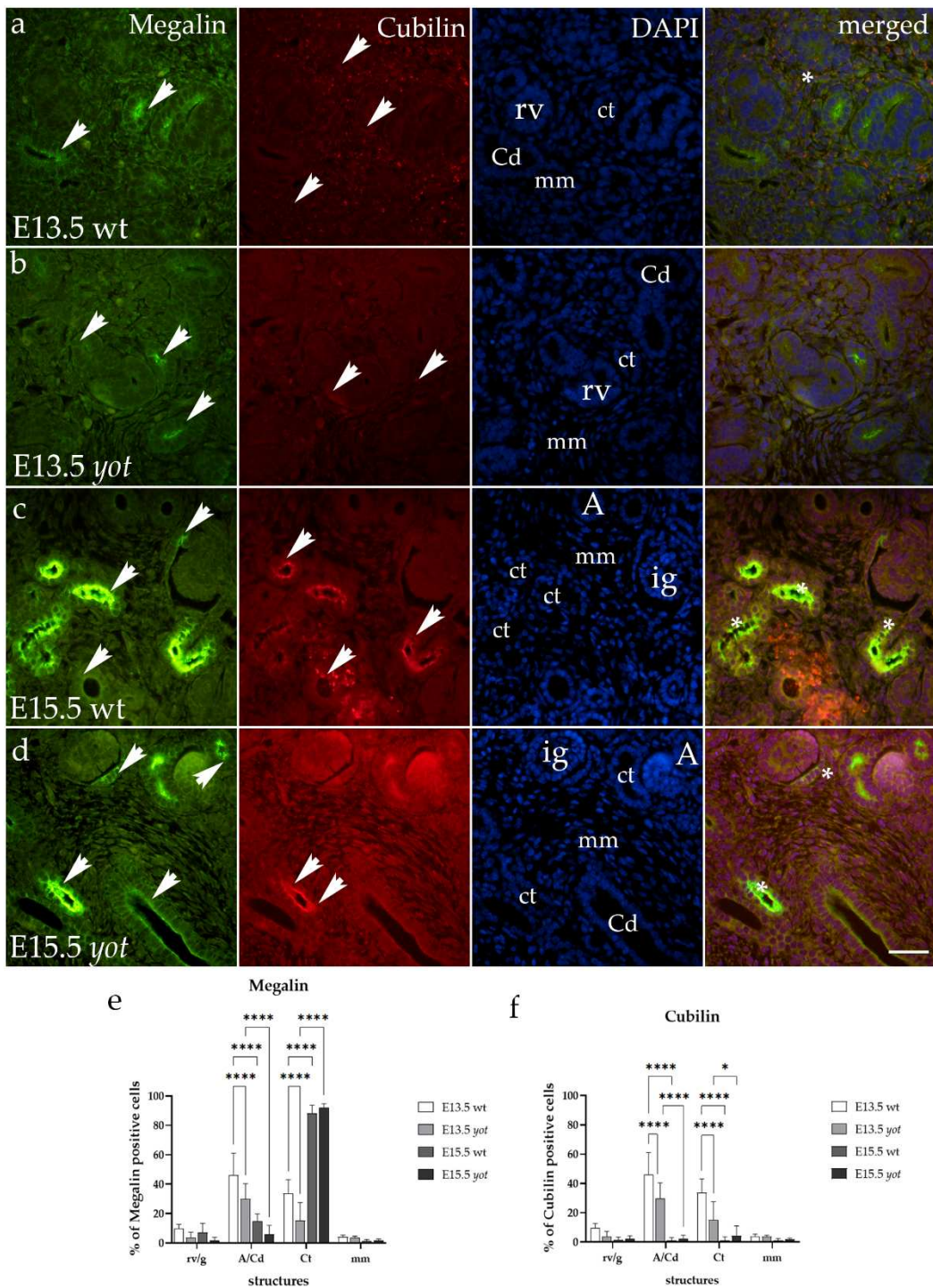
Za statističku analizu je korišten GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Normalnost distribucije podataka procijenjena je pomoću Shapiro-Wilkovog testa. Imunoekspresija ciljanih proteina je uspoređena korištenjem dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe kako bi se identificirale značajne razlike u postotku pozitivnih stanica između E15.5 i E13.5 za mm, g/rv, Ct i A/Cd te P4 i P14 za g, pct i dct. Dva parametra korištena u analizi ANOVE su bili fenotip u kombinaciji s promatranom vremenskom točkom (divlji tip miševa i yotari na E13.5, 15.5 ili P4 i P14) i substrukture bubrega (mm, rv/g, A /Cd, Ct, G, PCT i DCT). Ekspresija za postotak pozitivnih stanica bila je srednja vrijednost + standardna devijacija (SD). Razina značajnosti utvrđena je na  $p < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

## Megalin i Cubilin imunoekspresija

Megalin i Cubilin su bili visoko imunoekspresirani u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima u svim ispitanim stadijima (Slike 4 a–d). Imunoekspresija Megalina i Cubilina bila je najizraženija u zavijenim tubulima i parijetalnom sloju Bowmanove kapsule (Slika 4 c,d). Postotak stanica pozitivnih na Megalin kod E13.5 bio je veći kod divljeg tipa (wt) u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima u usporedbi s *yotom* ( $p < 0,0001$ ) (Slika 4 e). Na E15.5, imunoekspresija Megalina bila je veća u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima wta, nego u *yotu*, ali bez statističke značajnosti. Postotak stanica pozitivnih na Cubilin kod E13.5 bio je veći u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima usporedno s *yotom* ( $p < 0,0001$ ) (Slika 4 e). Kod E15.5 imunoekspresija Cubilina bila je veća u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima *yota*, nego kod wta, ali je bila bez statističke važnosti.

Uočeno je da se imunoekspresija Megalina i Cubilina smanjivala kako je razvoj napredovao u ampuli/sabirnim kanalićima, dok je u zavijenim tubulima postojao drugačiji obrazac s povećanjem Megalina i smanjenjem imunoekspresije Cubilina (Slika 4 e). Koekspresija Megalina i Cubilina opažena je na apikalnoj membrani zavijenih tubula i parijetalnom epitelu Bowmanove kapsule (Slika 4 c,d).



**Slika 4.** Dvostruko imunofluorescentno bojenje embrionalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša provedeno je pomoću markera Megalin (a–d) i Cubilin (a–d). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije Megalina i Cubilina u metanefričkom mezenhimu (mm), glomerulima (g), bubrežnim mjehurićima (rv), ampulama (A), zavijenim tubulima (Ct) i sabirnim kanalićima (Cd), kao što je prikazano na slici bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija bojenja Megalin, Cubilin, DAPI i spojene slike Megalina, Cubilina i DAPI primijećena je u embrionalnim

danima E13.5 i E15.5 kod divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d) bubrega. Zvezdica označava regiju u kojoj je otkrivena koekspresija. Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotci Megalina (e) i Cubilina (f) pozitivnih stanica u metanefričkom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (g), zavijenim tubulima (Ct) i ampulama (A) ili sabirnim kanalićima (Cd) bubrega divljeg tipa i *yotari* u embrionalnim danima 13,5 i 15,5. Podatci su predstavljani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*  $p < 0,05$  i \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Deset podstruktura procijenjeno je u svakoj vremenskoj točki.

Intenzitet bojenja Megalina kod wt miševa na E13.5 bio je najjači u ampuli/sabirnom kanalu, dok smo kod *yota* primijetili umjereni intenzitet bojenja u svim promatranim strukturama. Na E15.5 najjača reaktivnost pronađena je u zavijenim tubulima wt miševa i ampulama/sabirnim kanalićima u *yota* (Tablica 3).

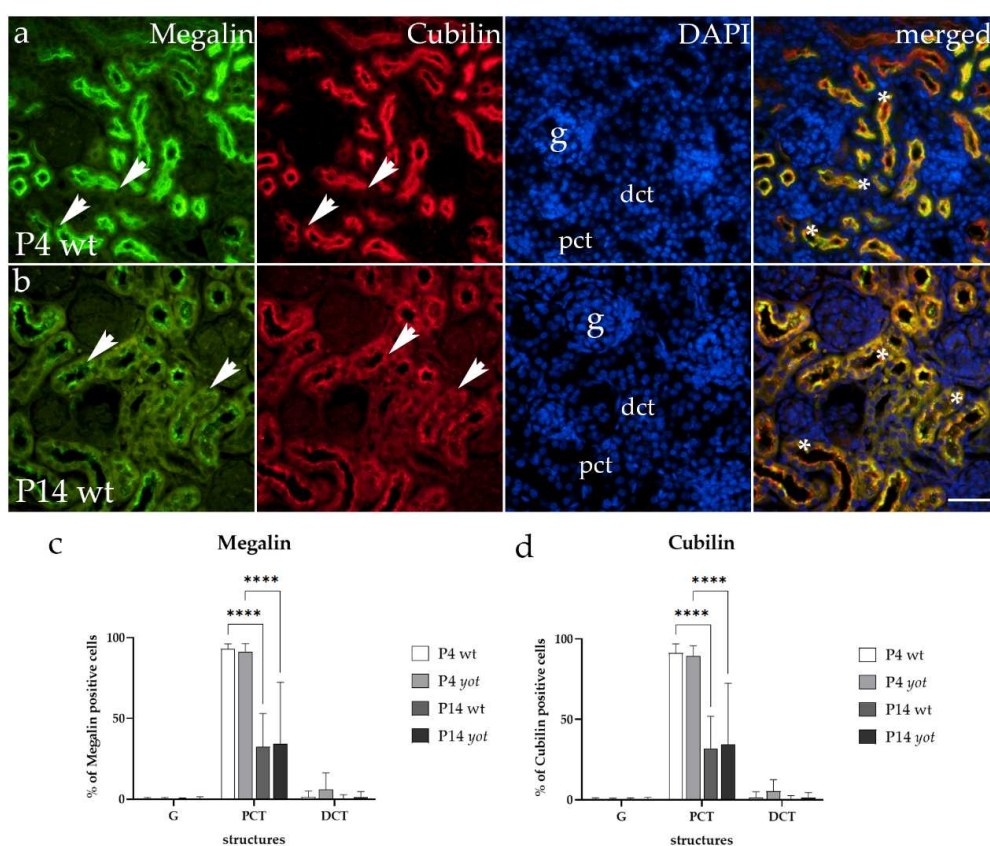
**Tablica 3.** Intenzitet bojenja specifičnih protutijela u bubrezima *yotari* i divljeg tipa miša u embrionalnim danima E13.5 i E15.5.

Embrionalni dan (E)	Životinja	Struktura	Megalin	Cubilin	Caveolin-1	Dab2IP	GIPC1	ARH
E13.5	divlji tip	mm	+	+++	+++	+	++	+++
		rv/g	+	+	-	+	+	+
		Ct	++	+	-	+	+	+
		A/Cd	+++	+	-	+	+	+
	<i>yotari</i>	mm	+	+	++	+	+++	+
		rv/g	++	+	-	-	-	+
		Ct	++	+	-	+	+	+
		A/Cd	++	+	-	+	+	+
E15.5	divlji tip	mm	+	+	++	-	-	+
		rv/g	+	+	+	-	-	+
		Ct	+++	+	+	+	++	+
		A/Cd	+	+	+	+	-	+
	<i>yotari</i>	mm	+	+	+	-	-	+
		rv/g	+	+	+	-	-	+

Ct	+	+++	+	-	-	+
A/Cd	+++	+	+	-	++	+++

+++ jaka reaktivnost; ++ umjerena reaktivnost; + blaga reaktivnost; - nema reaktivnosti; mm-metanefrični mezenhim, rv-bubrežni mjehurić, g-nezreli glomeruli, Ct-zavijeni tubul, A-ampula, Cd-sabirni kanal, E-dan embrionalnog razvoja.

U postnatalnim razvojnim fazama bojanje Megalinom i Cubilinom bilo je najizraženije u apikalnim membranama stanica proksimalnih zavojitih tubula (Slike 5 a,b). Postotak stanica pozitivnih na Megalin i Cubilin bio je najveći na P4 kod wt i *yot* miševa te se statistički se smanjio u kasnijoj razvojnoj fazi (P14) (Slika 5 c,d). Nije uočena značajna razlika između wt i *yot* miševa u promatranim strukturama u svim razvojnim fazama (Slika 5 c,d). Koekspresija Megalina i Cubilina primijećena je u proksimalnim zavijenim tubulima (Slika 5 a,b).



**Slika 5.** Dvostruko imunofluorescentno bojenje postnatalnih divljih i *yotari* mišjih bubrega provedeno je pomoću markera Megalin (a,b) i Cubilin (a,b). Strelice pokazuju uzorke imunoekspresije Megalina i Cubilina u glomerulima (g), distalnim zavijenim tubulima (dct) i



proksimalnim zavijenim tubulima (pct), naznačenim na slici bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Imunoekspresija bojanja Megalina i Cubilina te spojenih Megalina, Cubilina i DAPI-ja nakon 4 dana (P4) i 14 dana (P14) u divljem tipu. Divlji tip i *yotari* miševi u postnatalnom danu 4. i 14. dana razvoja bubrega pretežno su odgovarali lokalizaciji i intenzitetu Megalina i Cubilina. Stoga su reprezentativne slike uzete od miševa divljeg tipa. Zvezdica označava regiju u kojoj je otkrivena koekspresija. Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotci Megalina (c) i Cubilina (d) pozitivnih stanica u glomerulima (G), distalnim zavijenim tubulima (DCT) i proksimalnim zavijenim tubulima (PCT) postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* životinja tijekom vremena (P4 i P14). Podatci su predstavljani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je dvadeset podstruktura.

Što se tiče intenziteta bojenja, najveća reaktivnost zabilježena je u proksimalnim zavijenim tubulima u oba fenotipa u svim postnatalnim razvojnim fazama (Tablica 4).

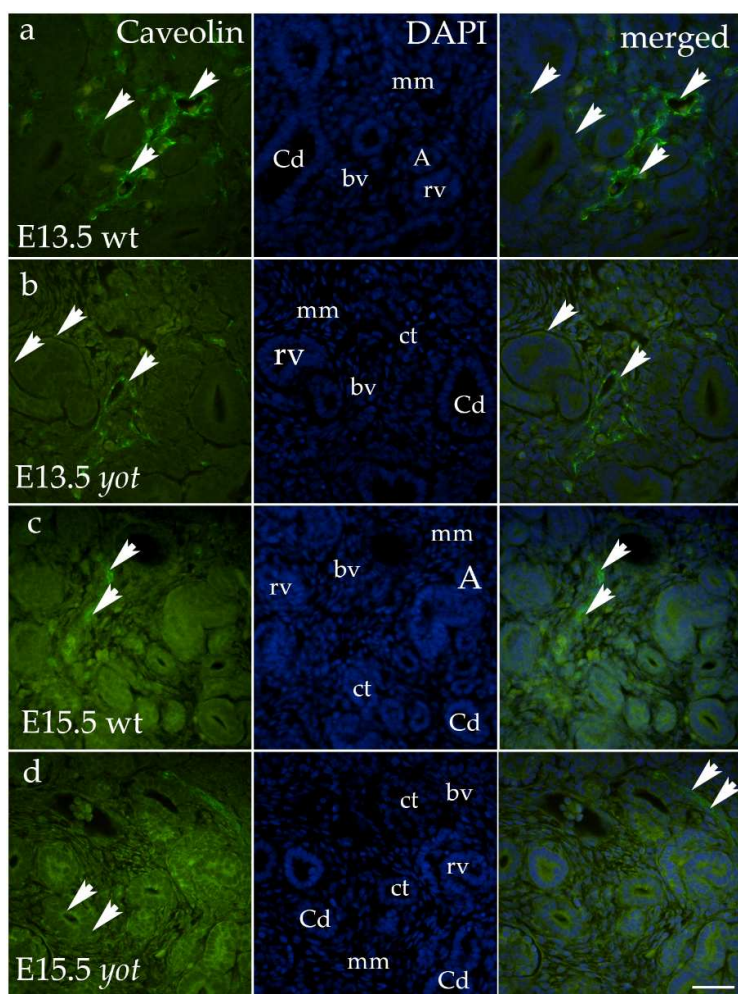
**Tablica 4.** Intenzitet bojenja specifičnih protutijela u bubrezima *yotari* i divljeg tipa miševa u postnatalnim danima P4 i P14.

Postnatalni dan	Životinje	Strukture	Megalin	Cubilin	Caveolin-1	Dab2IP	GIPC1	ARH
P4	divlji tip	g	-	-	+	-	+	+
		pct	+++	+++	-	-	-	+
		dct	+	+	-	+	+	++
	<i>yotari</i>	g	-	-	+	+	-	+
		pct	+++	+++	-	+	+	+
		dct	+	+	-	+	+	++
P14	divlji tip	g	-	-	+	-	-	+
		pct	+++	+++	-	-	+	+
		dct	+	+	-	+	+	++
	<i>yotari</i>	g	-	-	+	-	-	+
		pct	+++	+++	-	-	-	+
		dct	-	-	+	+	+	++

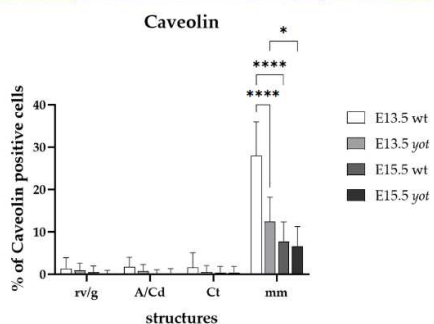
+++ jaka reaktivnost; + blaga reaktivnost; - nema reaktivnosti; g-glomeruli, pct-proksimalni zavijeni tubuli, dct-distalni zavijeni tubuli, p-dan postnatalnog razvoja

## Caveolin-1 imunoekspresija

Visoka imunoekspresija Caveolina-1 primijećena je u metanefričkom mezenhimu, u krvnim žilama i graničnom području između metanefričkog mezenhima i bubrežnih mjehurića u svim ispitivanim stadijima (Slike 6 a–d). Udio Caveolin-1 pozitivnih stanica na E13.5 i E15.5 bio je veći u masi u metanefričkom mezenhimu u usporedbi s *yotom* ( $p < 0,0001$  odnosno  $p < 0,001$ ) (Slika 6 e). Imunoekspresija Caveolina-1 smanjivala se s napredovanjem razvoja (Slika 6 e). Intenzitet bojenja bio je najjači u metanefričkom mezenhimu u oba fenotipa u svim ispitivanim stadijima (Tablica 3).

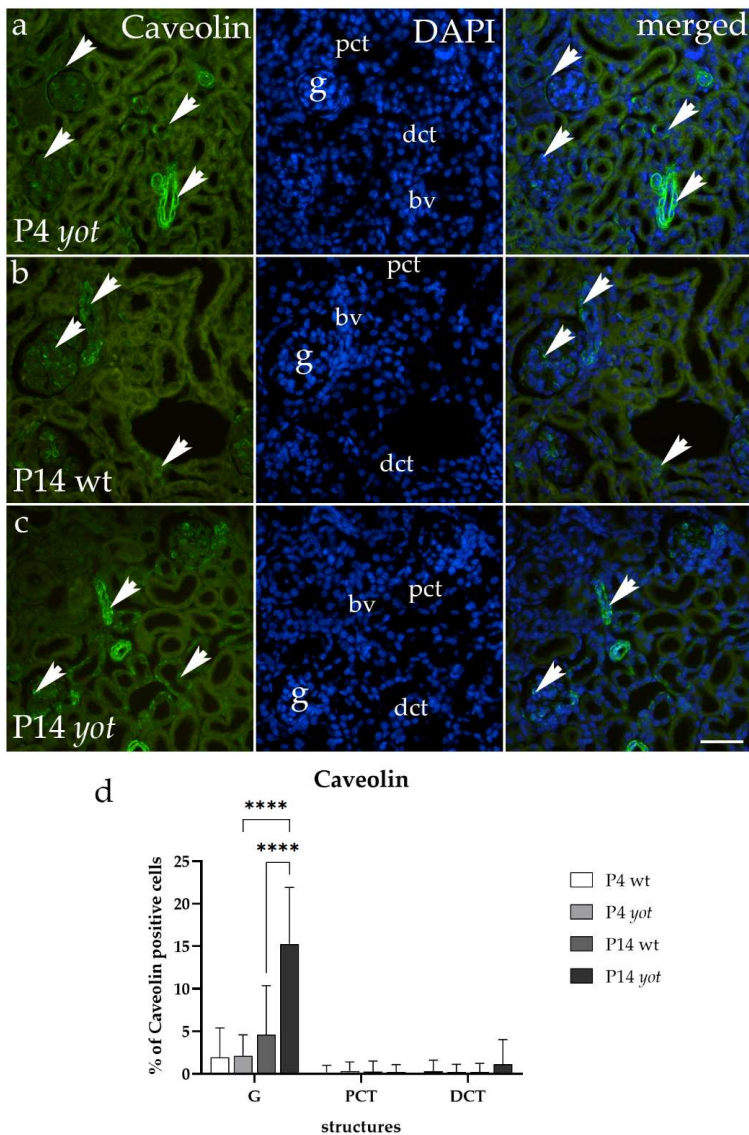


e



**Slika 6.** Imunofluorescentno bojenje embrionalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša provedeno je pomoću markera Caveolin-1 (a–d). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije Caveolina-1 u metanefričkom mezenhimu (mm), glomerulima (g), bubrežnim vezikulama (rv), ampulama (A), zavijenim tubulima (Ct) i sabirnim kanalićima (Cd), kao što je prikazano na 4 slike bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija Caveolina-1, bojanje DAPI-ja te spojene slike Caveolina-1 i DAPI-ja opažene su u embrionalnim danima E13.5 i E15.5 u bubrezima divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d). Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotci Caveolin-1 (e) pozitivnih stanica u metanefričkom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (g), zavijenim tubulima (Ct) i ampulama (A) ili sabirnim kanalićima (Cd) divljeg tipa i *yotari* bubrezi u embrionalnim danima 13.5 i 15.5 su prikazani. Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*  $p < 0,05$  i \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Deset podstruktura procijenjeno je u svakoj vremenskoj točki.

U postnatalnim razvojnim fazama bojanje Caveolinom-1 bilo je najizraženije u krvnim žilama, glomerulima i parijetalnom sloju Bowmanove kapsule (Slike 7 a-c). Udio Caveolin-1 pozitivnih stanica bio je najveći kod P14 kod *wta*, kao i kod miševa *yot*, a postojala je i statistički značajna razlika između P14 *wta* i *yota* (Slika 7 d). Također je postojala statistički značajna razlika u *yot* miševa u usporedbi s *wt* na P14 ( $p < 0,00001$ ).



**Slika 7.** Imunofluorescentno bojenje postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša izvedeno je pomoću markera Caveolin-1 (a–c). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije Caveolina-1 u glomerulima (g), distalnim zavijenim tubulima (dct) i proksimalnim zavijenim tubulima (pct), naznačenim na slici bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). Imunoekspresija bojenja Caveolinom-1 i spojenog Caveolina-1 i DAPI-ja nakon 4 dana (P4) i 14 dana (P14) kod miševa divljeg tipa (b) i *yotari* (a,c). Divlji tip i *yotari* miševi na postnatalnom danu 4 razvoja bubrega pretežno su odgovarali lokalizaciji i intenzitetu Caveolina-1. Stoga su reprezentativne slike uzete od miševa divljeg tipa. Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja  $100\ \mu\text{m}$  za sve slike. Postotci Caveolin-1 pozitivnih stanica (d), pozitivnih stanica u glomerulima (G), distalnim uvijenim tubulima (DCT) i proksimalnim zavijenim tubulima (PCT) postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* životinja tijekom vremena (P4 i P14). Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke

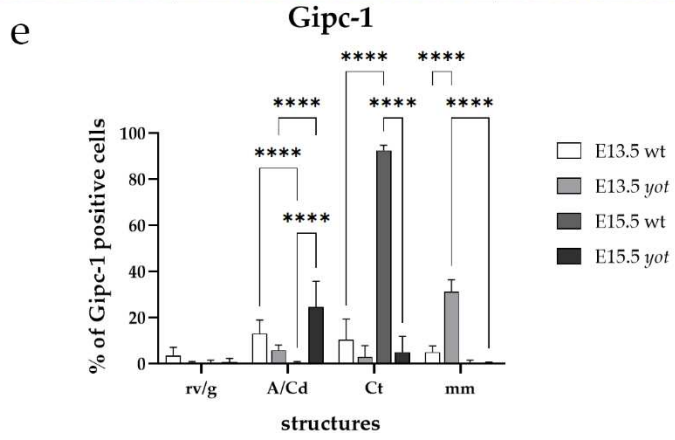
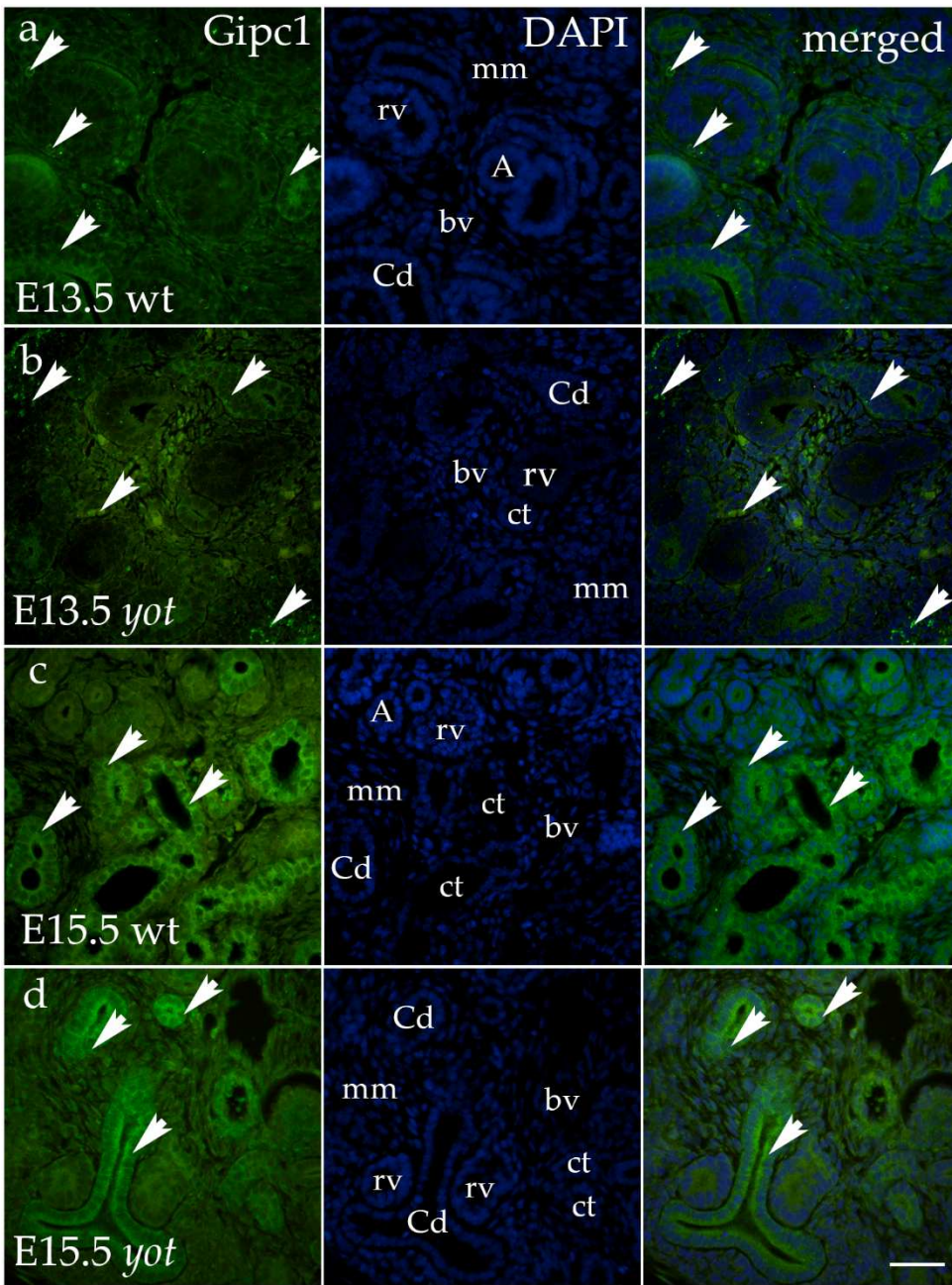
usporedbe. Značajne razlike označene su s \*\*\*\* $p < 0,0001$ . U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je dvadeset podstruktura.

Intenzitet bojenja Caveolina-1 bio je najjači u glomerulima oba fenotipa u svim ispitivanim stadijima dok su ostale strukture bile negativne (Tablica 4).

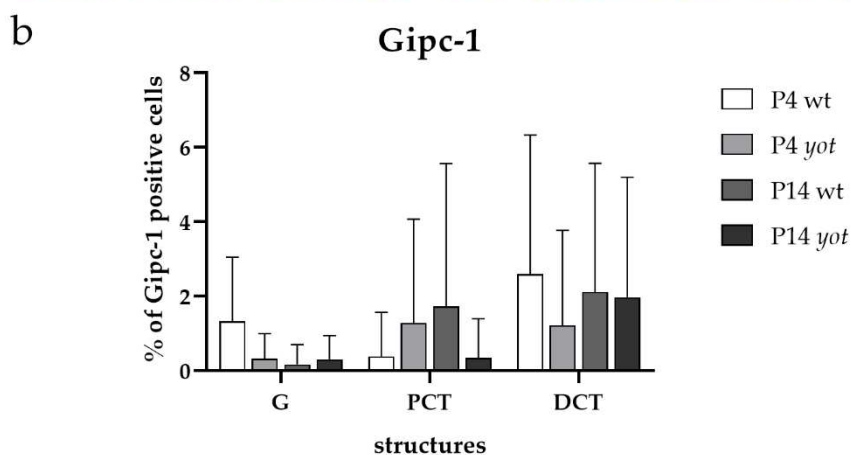
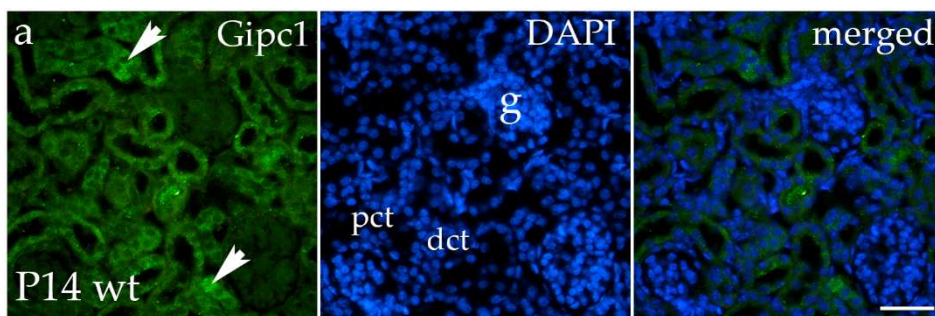
## **Gipc1 imunoekspresija**

Gipc1 uočen je kao difuzno citoplazmatsko bojenje u metanefričkom mezenhimu, zavijenim tubulima i sabirnim kanalićima (Slike 8 a–d). Udio pozitivnih Gipc1 stanica na E13.5 bio je najveći u *yotu* u metanefričkom mezenhimu u usporedbi s *wtom* ( $p < 0,0001$ ) (Slika 8 e). Na E15.5 postotak pozitivnih Gipc1 stanica bio je najveći u *yotu* u ampuli/sabirnim kanalićima u usporedbi s *wt* miševima (Slika 8 e). Dodatno, primijetili smo statistički značajno povećanje broja Gipc1 pozitivnih stanica u zavijenim tubulima *wt* miševa u usporedbi s *yotom* ( $p < 0,0001$ ) (Slika 8 e). Intenzitet bojenja bio je najjači u metanefričkom mezenhimu u oba fenotipa na E13.5 (Tablica 3). U kasnijoj razvojnoj fazi umjerena reaktivnost bojenja primijećena je u zavijenim tubulima *wta* i ampulama/sabirnim kanalićima *yot* miševa (Tablica 3).

U postnatalnom razdoblju Gipc1 je promatran kao punktuativni signal u citoplazmi svih promatranih struktura (Slika 9 a). Nije bilo statistički značajne razlike u promatranim strukturama između ispitivanih fenotipova u svim promatranim vremenskim točkama (Slika 9 b). Blagi intenzitet bojenja Gipc1 primijećen je u glomerulima i distalnim zavijenim tubulima kod *wt* miševa na P4 i P14 (Tablica 4). U *yot* miševa blagi intenzitet bojenja Gipc1 primijećen je u zavijenim tubulima (Tablica 4).



**Slika 8.** Imunofluorescentno bojenje embrionalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša provedeno je korištenjem markera *Gipc1* (a–d). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije *Gipc1* u metanefričkom mezenhimu (mm), glomerulima (g), bubrežnim mjehurićima (rv), ampulama (A), zavijenim tubulima (Ct) i sabirnim kanalićima (Cd), kao što je prikazano bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija *Gipc1*, DAPI bojanje i spojene slike *Gipc1* i DAPI opažene su u embrionalnim danima E13.5 i E15.5 u bubrezima divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d). Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotci *Gipc1* (e) pozitivnih stanica u metanefričkom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (g), uvijenim tubulima (Ct) i ampulama (A) ili sabirnim kanalićima (Cd) divljeg tipa i *yotari* prikazani su bubrezi u embrionalnim danima 13,5 i 15,5. Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Deset podstruktura procijenjeno je u svakoj vremenskoj točki.



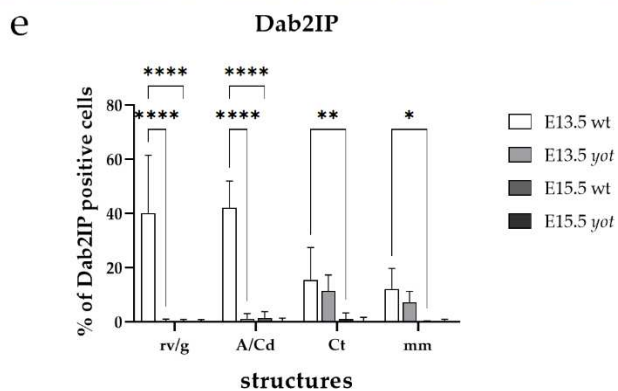
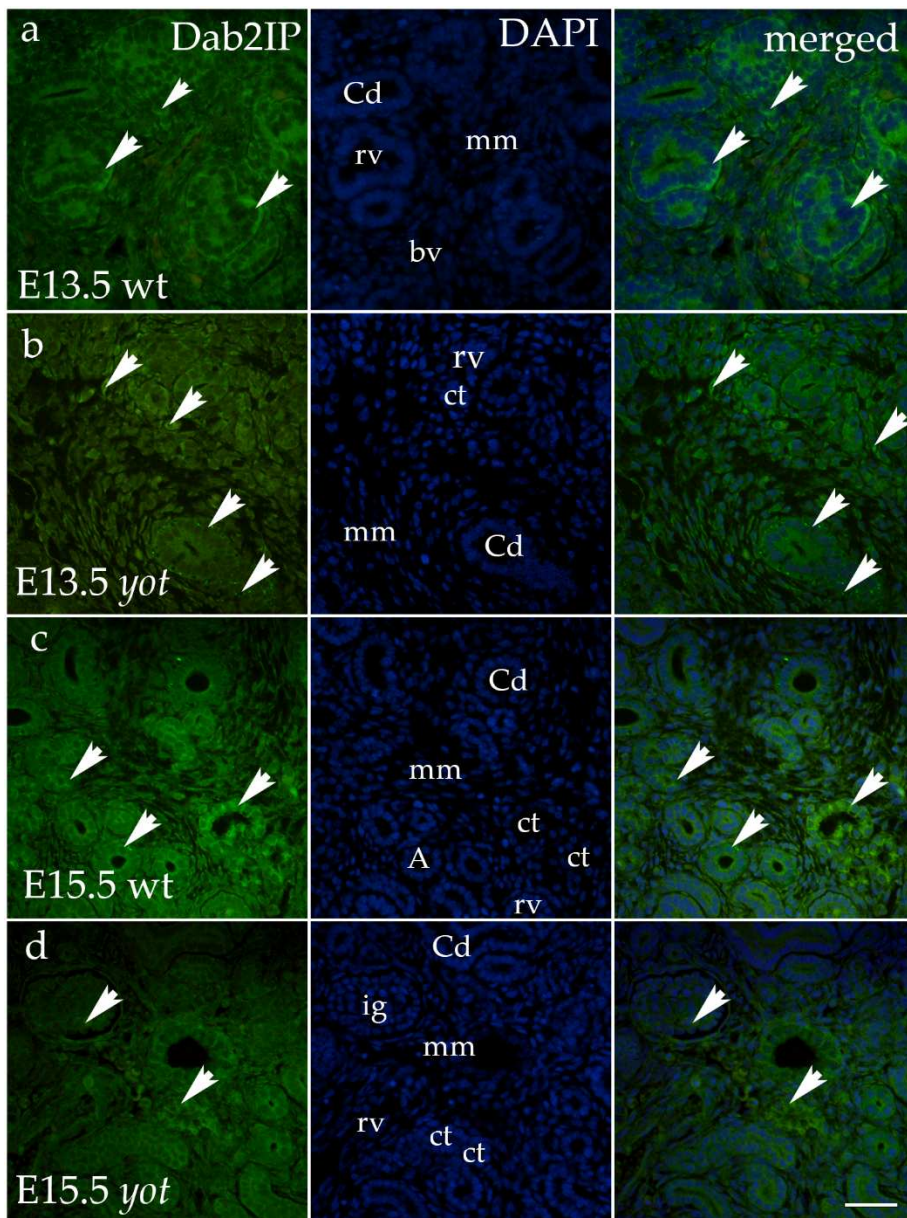
**Slika 9.** Imunofluorescentno bojenje postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša izvedeno je korištenjem markera *Gipc1* (a). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije *Gipc1* u glomerulima (g), distalnim zavijenim tubulima (dct) i proksimalnim zavijenim tubulima (pct), naznačenim na slici

bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija Gipc1 bojenja i spojenih Gipc1 i DAPI-ja nakon 14 dana (P14) u miševa divljeg tipa. Divlji tip i *yotari* miševi u postnatalnom danu 4. i 14. dana razvoja bubrega pretežno su odgovarali lokalizaciji i intenzitetu Gipc1. Stoga, su reprezentativne slike uzete od miševa divljeg tipa. Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotak starosti Gipc1 pozitivnih stanica (b), pozitivnih stanica u glomerulima (G), distalnim zavijenim tubulima (DCT) i proksimalnim zavijenim tubulima (PCT) postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* životinja tijekom vremena (P4 i P14). Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Dvadeset podstrukture je procijenjeno u svakoj vremenskoj točki.

### **Dab2IP imunoekspresija**

Najistaknutije bojenje Dab2IP primijećeno je u bubrežnim mjehurićima/glomerulima i ampuli/sabirnim kanalićima u wt miševa na E13.5 (Slike 10 a,c). U *yotu* je primijećeno bojenje u zavijenim tubulima i metanefričkom mezenhimu u istom razvojnem stadiju (Slika 10 b,d). Na E15.5 nije bilo reaktivnosti Dab2IP ni u jednoj strukturi ili bilo kojem promatranom stadiju (Slika 10 e). Uočili smo statistički značajnu razliku u postotku Dab2IP pozitivnih stanica u bubrežnim mjehurićima/glomerulima i ampuli/sabirnim kanalima wt miševa u usporedbi s *yotom* na E13.5 ( $p < 0,0001$ ) (Slika 10 e). Blagi intenzitet bojenja primijećen je u oba fenotipa i svim strukturama na E13.5 (Tablica 3). U kasnijoj razvojnoj fazi blaga reaktivnost bojenja primijećena je u zavojitim tubulima i ampuli/sabirnim kanalima kod wt miševa, dok nikakva reaktivnost nije primijećena kod *yot* miševa (Tablica 3).

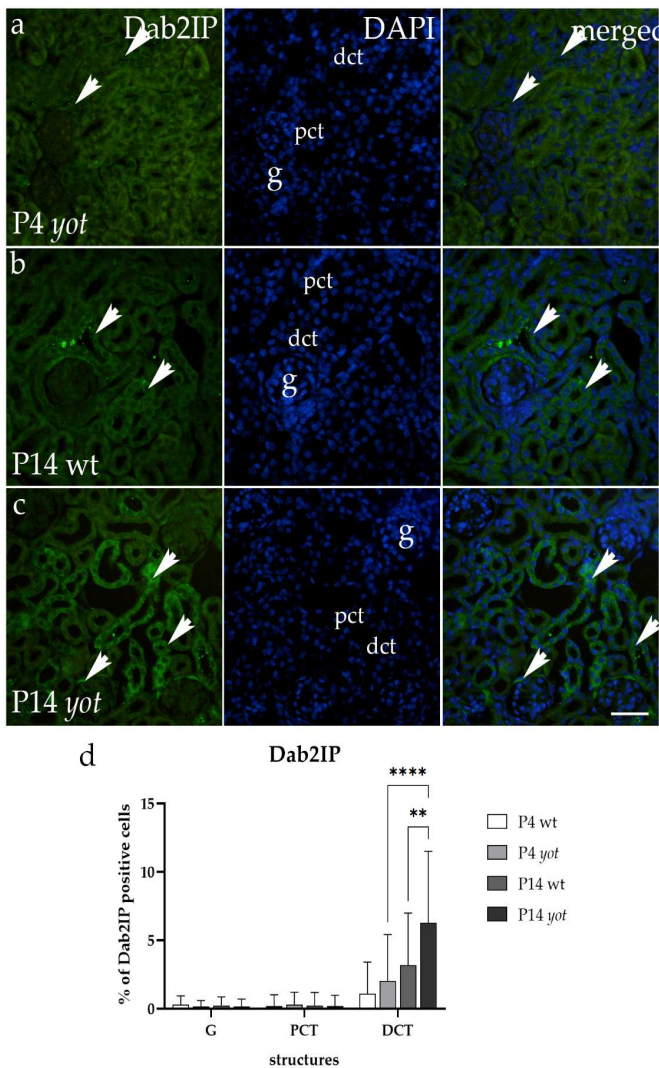




**Slika 10.** Imunofluorescentno bojenje embrionalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša provedeno je pomoću markera Dab2IP (a–d). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije Dab2IP u metanefričkom mezenhimu (mm), glomerulima (g), bubrežnim vezikulama (rv), ampulama (A), zavijenim tubulima

(Ct) i sabirnim kanalićima (Cd), kao što je prikazano bojenja jezgri 4'6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija Dab2IP, DAPI bojanje i spojene slike Gipc1 i DAPI-ja primijećene su u embrionalnim danima E13.5 i E15.5 u bubrezima divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d). Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotci Dab2IP (e) pozitivnih stanica u metanefričkom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (g), zavijenim tubulima (Ct) i ampulama (A) ili sabirnim kanalićima (Cd) divljeg tipa i *yotari* bubrezi u embrionalnim danima 13.5 i 15.5 su prikazani. Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Deset podstruktura procijenjeno je u svakoj vremenskoj točki.

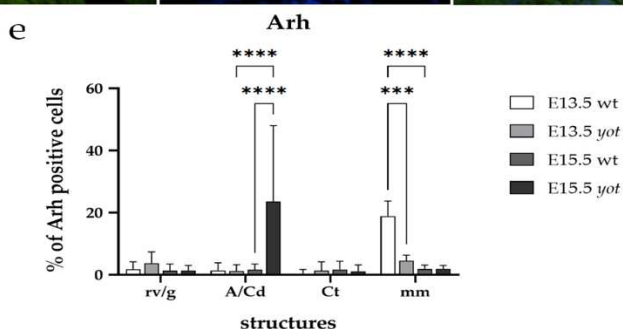
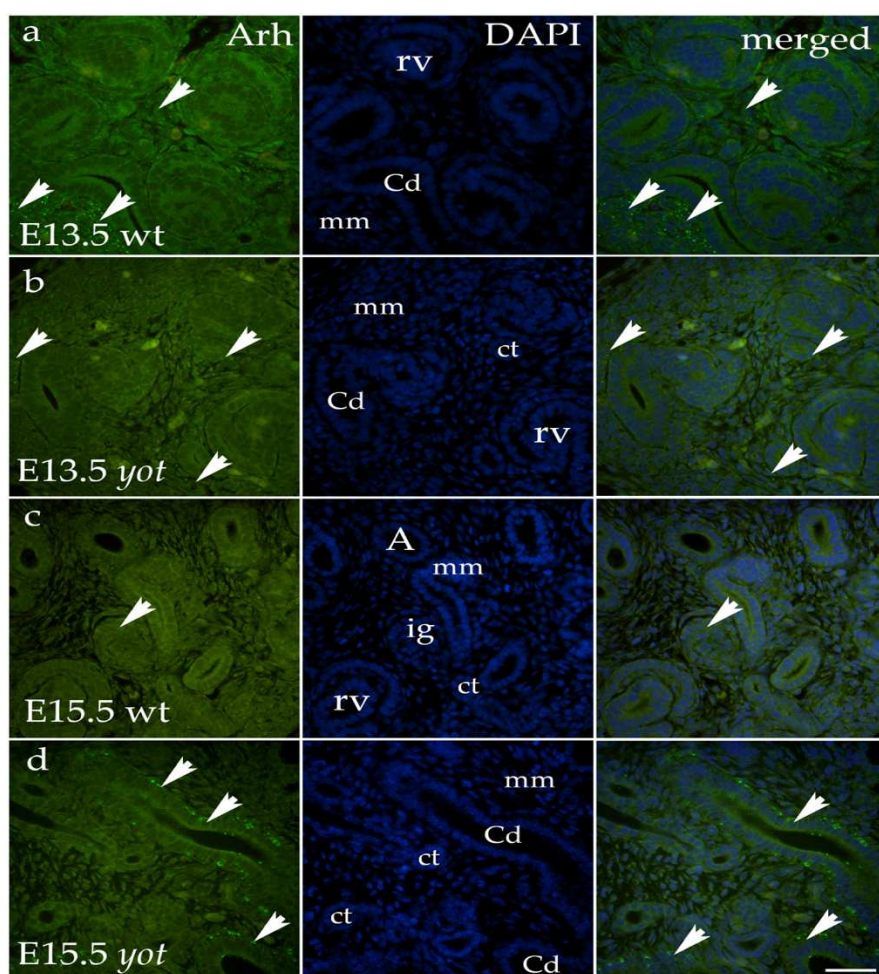
Postnatalno Dab2IP je opažen kao punktuativno bojenje u distalnim zavijenim tubulama i parijetalnom sloju Bowmanove kapsule (Slike 11 a–c). Postotak Dab2IP pozitivnih stanica bio je najviši na P14 kod wt i *yot* miševa, a postojala je i statistički značajna razlika u postotku Dab2IP pozitivnih stanica u distalnim zavijenim tubulima na P4 i P14 kod wt i *yot* miševa ( $p < 0,00001$  odnosno  $p < 0,01$ ) (Slika 11 d). Intenzitet bojenja Dab2IP bio je blag u distalnim zavijenim tubulima u oba fenotipa u svim promatranim stadijima (Tablica 4), dok u drugim strukturama nije bilo reaktivnosti.



**Slika 11.** Imunofluorescentno bojenje postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša izvedeno je korištenjem markera Dab2IP (a–c). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije Dab2IP u glomerulima (g), distalnim zavijenim tubulima (dct) i proksimalnim zavijenim tubulima (pct), naznačenim na slici bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija bojenja Dab2IP i spojenih Dab2IP i DAPI nakon 4 dana (P4) i 14 dana (P14) kod divljeg tipa (b) i *yotari* (a,c) miševa. Divlji tip i *yotari* miševi na postnatalnom 4. danu razvoja bubrega pretežno su odgovarali lokalizaciji i intenzitetu Dab2IP. Stoga su reprezentativne slike uzete od miševa *yotari* tipa. Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja 100  $\mu\text{m}$  za sve slike. Postotci Dab2IP pozitivnih stanica (d) u glomerulima (G), distalnim zavijenim tubulima (DCT) i proksimalnim zavijenim tubulima (PCT) postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* životinja tijekom vremena (P4 i P14). Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . U svakoj vremenskoj točki procijenjeno je dvadeset podstruktura.

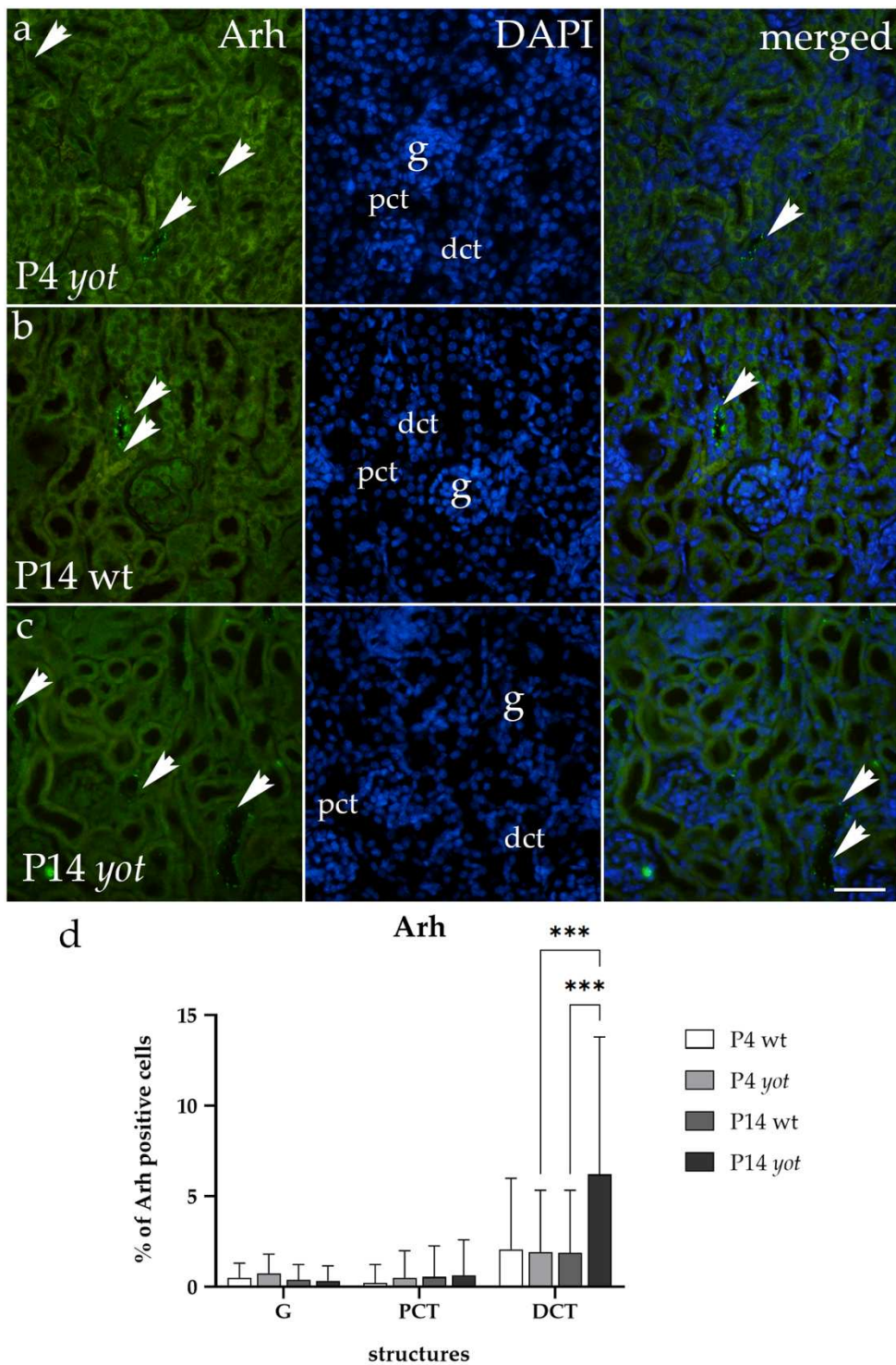
## ARH imunoekspresija (znanstveni doprinos)

Najizraženije ARH bojenje na E13.5 primijećeno je u metanefričkom mezenhimu u wt i *yot* miševa (Slike 12 a-d). Na E15.5 najistaknutiji uzorak bojenja primijećen je u ampuli/sabirnim kanalićima kod miševa divljeg tipa (Slika 12 c). Uočili smo statistički značajnu razliku u postotku ARH pozitivnih stanica u metanefričkom mezenhimu na E13,5 wt miševa u usporedbi s *yotom* ( $p < 0,001$ ) (slika 12 e) i ampulom/sabirnim kanalićima na E15,5 wt miševa u usporedbi s *yotom* ( $p < 0,0001$ ). Jak intenzitet točkastog bojenja opažen je u metanefričkom mezenhimu na E13.5 wt životinja (Tablica 3). U kasnijoj razvojnoj fazi primijećena je jaka reaktivnost bojenja u ampulama/sabirnim kanalićima *yot* miševa (Tablica 3).



**Slika 12.** Imunofluorescentno bojenje embrionalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša provedeno je pomoću markera ARH-a (a–d). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije ARH-a u metanefričkom mezenhimu (mm), glomerulima (g), bubrežnim vezikulama (rv), ampulama (A), zavijenim tubulima (Ct) i sabirnim kanalićima (Cd), kao što je prikazano bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija ARH-a, bojanje DAPI-ja i spojene slike ARH-a i DAPI-ja opažene su u embrionalnim danima E13.5 i E15.5 u bubrezima divljeg tipa (a,c) i *yotari* (b,d). Slike su snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja  $100 \mu\text{m}$  za sve slike. Postotci ARH-a (e) pozitivnih stanica u metanefričkom mezenhimu (mm), bubrežnim mjehurićima (rv) ili glomerulima (g), zavijenim tubulima (Ct) i ampulama (A) ili sabirnim kanalićima (Cd) divljeg tipa i *yotari* bubrezi u embrionalnim danima 13.5 i 15.5 su prikazani. Podacti su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Značajne razlike označene su s \*  $p < 0,05$  i \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Deset podstrukture procijenjeno je u svakoj vremenskoj točki.

ARH pozitivnih stanica bilo je najviše u distalnim zavojitim tubulima na P4 i značajno se povećao u kasnijim razvojnim fazama u *yot* miševa (Slika 13 a-c). Uočena je značajna razlika između wt i *yot* miševa u distalnim zavijenim tubulima na P14 ( $p < 0,001$ ) (Slika 13 d).



**Slika 13.** Imunofluorescentno bojenje postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* miša izvedeno je korištenjem markera ARH (a-c). Strelice pokazuju obrasce imunoekspresije ARH-a u glomerulima (g), distalnim zavijenim tubulima (dct) i proksimalnim zavijenim tubulima (pct), naznačenim na slici bojenja jezgri 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI). Imunoekspresija ARH-a bojenja i spojenih ARH-a i DAPI-ja nakon 4 dana (P4) kod *yotari* i 14 dana (P14) u miševa divljeg tipa te *yotari*. Slike su

snimljene pri povećanju  $\times 40$ , a traka mjerila predstavlja  $100 \mu\text{m}$  za sve slike. Postotak ARH-a pozitivnih stanica (d) u glomerulima (G), distalnim zavijenim tubulima (DCT) i proksimalnim zavijenim tubulima (PCT) postnatalnih bubrega divljeg tipa i *yotari* životinja tijekom vremena (P4 i P14). Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (okomita crta) i analizirani pomoću dvosmjerne ANOVE praćene Tukeyjevim testom višestruke usporedbe. Dvadeset podstruktura procijenjeno je u svakoj vremenskoj točki.

## **5. RASPRAVA**



Postoji niz endocitnih proteina koji prenose signalne informacije do stanica. Točnije, oni djeluju preko liganda koji se vežu na receptore imunoeksprimirane na njihovim ciljnim stanicama (137). Stoga smo u ovoj studiji željeli istražiti neke od tih signalnih proteina tijekom razvoja bubrega i njihovu potencijalnu funkciju u CAKUT-u. CAKUT je spektar embrionalnih poremećaja u bubrezima i izlaznom mokraćnom traktu (30). Mnogi geni i mutacije upleteni su u nastanak ovih stanja. Prethodne studije s *yotari* miševima otkrile su različite markere i kako poremećaj praćenja signalizacije može uzrokovati CAKUT (1,17,18,138).

U našem istraživanju koristili smo model miša *Dab1*<sup>-/-</sup> i pretpostavili smo da ekspresija endocitnih receptora, kao što su Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 i Dab2IP ima različite obrasce u embrionalnom i postnatalnom razvojnem razdoblju.

Megalin i Cubilin pokazali su različite obrasce imunoekspresije u različitim fazama razvoja *wt* i *yota* bubrega unutar bubrežnih struktura. U studiji koju su proveli De i sur. utvrđeno je da je Megalin imunoeksprimiran na granici četke proksimalnih tubula bubrega, sustavu recikliranja membrane i endocitnim odjeljcima (135). Megalin se može naći u lizosomima, ali nakon endocitoze, gusti apikalni tubuli vraćaju glavne količine Megalina u apikalnu membranu (46,139). Slično tome, naša je studija uočila visoku imunoekspresiju Megalina u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima u svim ispitivanim stadijima u embrionalnom razdoblju i proksimalnim zavijenim tubulima u postnatalnim fazama. Dodatno, promatrali smo imunoekspresiju Megalina u parijetalnom sloju Bowmanove kapsule i glomerula. Istraživanje Prabakarana i sur. pokazalo je da je imunoekspresija Megalina u podocitima identificirana kod štakora i ljudi (69). Svi ovi nalazi sugeriraju da ovaj protein ima značajnu ulogu u ovim bubrežnim strukturama tijekom razvoja i ukazuje na njegovu uključenost u važne fiziološke procese unutar bubrega.

Zanimljivo je da je naša studija otkrila smanjeni postotak Megalin-pozitivnih stanica u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima *yot* miševa u usporedbi s *wt* miševima na E13.5. Ovaj je nalaz u skladu sa studijom koju su proveli Motoyoshi i sur., koji je dokumentirao da je glomerularna ozljeda prisutna kod miševa sa smanjenom imunoekspresijom Megalina (140). U postnatalnom razdoblju postotak pozitivnih megalinskih stanica bio je najveći na P4 kod *wt* i *yot* miševa i smanjio se u kasnijoj razvojnoj fazi (P14). Ovo otkriće ukazuje na važnost Megalina tijekom nefrogeneze i pravilne diferencijacije nefrona. Osobito je važno za endocitozni proces unutar proksimalnih zavijenih tubula budući da gubitak takvog Megalina može pridonijeti razvoju proteinurije, važnog kliničkog pokazatelja bolesti bubrega (135). Dodatno, Megalin igra važnu ulogu u endocitozi različitih liganada, koji posreduju u prometu Megalina u proksimalnim tubularnim

epitelnim stanicama. To bi mogao biti potencijalni terapijski cilj za nefrotoksičnost uzrokovanu lijekovima ili metaboličku bolest bubrega (46).

Imunoekspresija Cubilina bila je viša kod wt miševa u usporedbi s *yotom* kod E13.5 dok kod E15.5 imunoekspresija Cubilina bila je niska u *wta*, kao i u *yota*. To bi moglo upućivati na složeno međudjelovanje između imunoekspresije Cubilina i razvojnih faza, potencijalno ukazujući na potrebu za kompenzacijskim mehanizmima u *yot* miševa s manjkavom imunoekspresijom Cubilina na E13.5 u usporedbi s *wtom*. U postnatalnim razvojnim fazama bojanje Cubilinom bilo je najizraženije na apikalnim membranama stanica proksimalnih zavojitih tubula. Ovo otkriće u skladu je s ulogom Cubilina u bubrezima budući da je to ključni protein potreban za reapsorpciju tubularnog proteina, uključujući albumin (139). Naime, Cubilin se obilno imunoeksprimira na proksimalnom tubulu i veže se s Megalinom posljedično povećavajući njihovu multiligandnu sposobnost. Stoga, koekspresija Megalina i Cubilina na apikalnoj membrani zavojitih tubula ukazuje na njihovu važnost u reapsorpciji i pravilnoj funkciji nefrona. Naime, dokazano je da Cubilin stupa u interakciju s različitim unutarstaničnim proteinima za promet, kao i s drugim membranskim molekulama, poput Cubilin-AMN kompleksa (135).

Primijetili smo visoku imunoekspresiju Caveolina-1 u metanefričkom mezenhimu, krvnim žilama i graničnom području između metanefričkog mezenhima i bubrežnog mjehurića u svim ispitivanim stadijima razvoja. Ovaj široko rasprostranjeni obrazac imunoekspresije sugerira da Caveolin-1 može imati ključnu ulogu u raznim procesima ključnima za razvoj bubrega, uključujući mezenhimalno-epitelni prijelaz, vaskularizaciju i međustanične interakcije unutar nefrona. Zanimljivo je da je postotak pozitivnih stanica s Caveolinom-1 u metanefričkom mezenhimu bio značajno viši u wt miševa u usporedbi s *yot* miševima i na E13.5 i na E15.5, što ukazuje na potencijalne razlike u regulaciji Caveolina-1 između dva fenotipa tijekom ranog razvoja bubrega. Osim toga, imunoekspresija Caveolina-1 smanjivala se s napredovanjem razvoja, što ukazuje na dinamičku regulaciju imunoekspresije Caveolina-1 tijekom organogeneze bubrega. Naši su rezultati u skladu sa studijom Luo i sur., koji su otkrili da Caveolin-1 ima važnu ulogu u staničnom metabolizmu tijekom autofagije. Naime, autofagija je usko povezana s metabolizmom i preživljavanjem stanica, što je važno za pravilnu nefrogenezu (138,141). Nadalje, bojanje Caveolinom-1 bilo je najizraženije u krvnim žilama, glomerulima i vanjskom sloju Bowmanove kapsule u postnatalnim razvojnim fazama. Ovaj obrazac distribucije sugerira potencijalne uloge Caveolina-1 u biološkim aktivnostima stanica, uključujući metabolizam i rast stanica. Najveći postotak Caveolin-1 pozitivnih stanica primijećen je na P14 u wt i u *yot* miševa, sa statistički značajnom razlikom između dva fenotipa u ovoj fazi. Ovo otkriće ukazuje na potencijalne implikacije disregulacije Caveolina-1 u kontekstu postnatalnog

razvoja i funkcije bubrega. Naime, Caveolin-1 može imati moguću ulogu u patofiziologiji akutne ozljede bubrega reguliranjem staničnog metabolizma i aktivnosti u vezi sa staničnim životom (33). Ovi su nalazi korišteni za razvoj Caveolin-1 ciljanih tretmana za različite bolesti, uključujući bolesti bubrega. Štoviše, intenzitet bojenja Caveolina-1 bio je najjači u glomerulima oba fenotipa u svim ispitivanim stadijima, što ukazuje na specifičnu ulogu Caveolina-1 u fiziologiji glomerula. Naši rezultati su u skladu s istraživanjem glomerulonefritisa koje je pokazalo dosljedne promjene u transkriptomu bubrega, što može ukazivati na to kako abnormalni stanični metabolizam igra važnu ulogu u ovoj bolesti (142). Odsutnost bojenja Caveolin-1 u drugim strukturama u našoj studiji sugerira na selektivan obrazac imunoekspresije Caveolina-1 unutar bubrega.

Gipcl je pokazao difuzno citoplazmatsko bojenje tijekom razvoja bubrega u metanefričkom mezenhimu, zavijenim tubulima i sabirnim kanalićima. Ova rasprostranjena distribucija sugerira potencijalnu uključenost Gipcl u različite stanične procese unutar ovih bubrežnih struktura, kao što je stanična signalizacija, citoskeletna organizacija i unutarstanično djelovanje. Gipcl je spona koja organizira signalizaciju posredovanu receptorima, a nakon internalizacije receptora povezuje se s endocitnim vezikulama u blizini plazma membrane (143). Zanimljivo je da je postotak Gipcl pozitivnih stanica kod E13.5 bio najveći u *yot* miševa u usporedbi s wt miševima u metanefričkom mezenhimu, što ukazuje na potencijalne razlike u regulaciji Gipcl između dva fenotipa tijekom ranog razvoja bubrega. Međutim, do E15.5 postotak Gipcl pozitivnih stanica bio je najveći u *yot* miševa u ampuli/sabirnim kanalićima u usporedbi s wt miševima, što ukazuje na kompenzacijske promjene u Gipcl imunoekspresiji u kasnijim fazama. Nadalje, primijećeno je povećanje broja Gipcl pozitivnih stanica u zavijenim tubulima wt miševa u usporedbi s *yot* miševima na E15.5, što ukazuje na potencijalne dinamičke razlike u Gipcl imunoekspresiji unutar specifičnih bubrežnih struktura tijekom razvoja. Intenzitet bojenja Gipcl bio je najjači u metanefričkom mezenhimu u oba fenotipa na E13.5, što ukazuje na potencijalnu ulogu Gipcl u ranim razvojnim procesima bubrega koji se odvijaju unutar ove strukture. U kasnijim razvojnim fazama primijećena je umjerena reaktivnost bojenja u zavijenim tubulima wt miševa i ampulama/sabirnim kanalima *yot* miševa, što pokazuje moguće promjene u imunoekspresiji i distribuciji Gipcl kako razvoj napreduje. Tijekom postnatalnog razdoblja, Gipcl opažen je kao isprekidani signal u citoplazmi svih promatranih struktura. Lou i sur. pokazali su da se Gipcl može naći u jamicama obloženim klatrinom, kao i u apikalnim tubulima endocitnih odjeljaka bubrežne četke (144). Pojava i interakcija Gipcl s Megalinom u endosomskim odjeljcima proksimalnih tubula ukazuje da bi to mogao biti model koji regulira endocitnu funkciju Megalina (144).

DAB2IP je uključen u regulaciju niza različitih bioloških procesa, uključujući proliferaciju (145) i prijelaz epitela u mezenhim (146). Naši rezultati pokazali su da je uzorak imunoekspresije Dab2IP varirao tijekom razvoja bubrega i postnatalnih faza između wt i *yot* miševa. Na E13.5 Dab2IP bojanje vidljivo je u bubrežnim mjehurićima/glomerulima i ampuli/sabirnim kanalima kod wt miševa, dok je kod *yot* miševa bojanje pretežno primijećeno u zavojitim tubulima i metanefričkom mezenhimu. Ovo ukazuje na različitu lokalizaciju Dab2IP u tim razvojnim fazama zbog odgođene imunoekspresije Dab2IP u *yot* miševa u mezenhimskim strukturama kao prekursori budućih nefrona. Nadalje, na E15.5 došlo je do odsutnosti Dab2IP reaktivnosti u svim strukturama i stadijima, što ukazuje na stabilnu regulaciju Dab2IP imunoekspresije tijekom ove faze. U postnatalnom stadiju, bojanje Dab2IP uočeno je kao punktuativno bojenje u distalnim zavijenim tubulima i parijetalnom sloju Bowmanove kapsule. Najveći postotak Dab2IP pozitivnih stanica primijećen je na P14 u wt i u *yot* miševa, sa značajnim razlikama između P4 i P14 u oba fenotipa i gotovo dvostruko većim postotkom imunoekspresije u *yot* miševa. Ovo sugerira odgođenu regulaciju imunoekspresije Dab2IP postnatalno zbog uključenosti Dab2IP u signaliziranje protein kinaza aktiviranih mitogenom. Naime, pokazalo se da Dab2IP regulira RAS-ERK signalni put, gdje smanjenje Dab2IP dovodi do aktivacije MAPK puta koji odgovara na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu nužnu za konačnu nefrogenezu bubrega (18,147,148). Stoga, visoka imunoekspresija Dab2IP u *yot* miševa u postnatalnom stadiju može implicirati neregulirano preživljavanje i puteve apoptoze.

ARH ima ključnu ulogu u razvoju i funkciji bubrega s mnogim obrascima ekspresije i funkcijama uočenima u različitim razvojnim fazama. Tijekom embrionalnog razvoja primijećeno je izraženo ARH bojenje u metanefričkom mezenhimu na E13.5 i u ampuli/sabirnim kanalima na E15.5, s višim postotkom ARH pozitivnih stanica u miševa divljeg tipa u usporedbi s *yot* mutantima (134). Ovaj diferencijalni izraz sugerira da je ARH uključen u ranu morfogenezu nefrona te da pridonosi strukturalnoj organizaciji ključnih komponenti bubrega. Postnatalno se ekspresija ARH-a pomiče na apikalne membrane distalnih zavojitih tubula s primjetnim porastom ARH pozitivnih stanica u *yot* miševa, posebno na P14. Ovaj prijelaz u ekspresiji vjerojatno odražava rastuću ulogu ARH-a u regulaciji funkcije bubrega. Funkcionalno, ARH je bitan za endocitnu trgovinu i transport iona budući da olakšava internalizaciju proteina, poput Megalina i ROMK-a duž puta posredovanog klatrinom (149). U distalnom nefronu ARH se lokalizira zajedno s ROMK-om regulirajući njegovu endocitozu kao odgovor na fluktuacije kalija u prehrani. Ova je regulacija ključna za održavanje homeostaze kalija s nokaut modelima ARH-a koji pokazuju oslabljenu ekspresiju ROMK-a kao odgovor na promjene unosa kalija (150). Snažna ekspresija ARH-a u bubrežnom tkivu, posebno u distalnom nefronu, naglašava njegovu dvostruku ulogu u razvojnom sastavljanju struktura nefrona i postnatalnoj regulaciji ionske ravnoteže. Štoviše, uključenost ARH-a u centrosomalno sastavljanje i citokinezu

ukazuje na šire stanične funkcije koje nadilaze njegovu ulogu u metabolizmu lipida (151) dodatno naglašavajući njegovu višestruku važnost u fiziologiji bubrega. Izmijenjena ekspresija ARH-a u *yotari* miševa pokazuje kako je njegov doprinos važan u razvoju bubrega i održavanju funkcionalnih transportnih sustava iona (132).

Primarno ograničenje naše studije je njezin promatrački dizajn. Nismo proveli kvantitativne analize imunoekspresije proteina, poput protočne citometrije ili Western blottinga. Još jedno ograničenje je u tome što nismo potvrdili protutijela u staničnoj kulturi kako bismo naglasili njihovu specifičnost.

## **6. ZAKLJUČAK**

Naši rezultati daju vrijedan uvid u prostorno-vremenski obrazac imunoekspresije i potencijalne uloge Megalina, Cubilina, Caveolina-1, Gipc1, Dab2IP i ARH-a u razvoju bubrega i postnatalnom sazrijevanju wt i *yot* miševa ističući dinamičku prirodu njihove regulacije i potencijalne implikacije za bubrežnu patologiju u gubitku funkcije Dab1. Ovi nalazi pridonose razumijevanju molekularnih mehanizama koji leže u pozadini razvoja bubrega i CAKUT-a pružajući vrijedan uvid u potencijalne terapijske ciljeve i dijagnostičke markere za bubrežne bolesti i abnormalnosti u razvoju. Daljnje studije, koje razjašnjavaju točne uloge i interakcije ovih proteina, mogle bi doprinijeti boljem razumijevanju razvoja bubrega i mogu ponuditi terapijske ciljeve za bubrežne poremećaje.

## **7. LITERATURA**



1. Lozić M, Filipović N, Jurić M, Kosović I, Benzon B, Šolić I, Kelam N, Racetin A, Watanabe K, Katsuyama Y, Ogata M, Saraga-Babić M, 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 Jan 28;22(3):1284. doi: 10.3390/ijms22031284. PMID: 33525532; PMCID: PMC7865779.
2. Yoneshima H, Nagata E, Matsumoto M, Yamada M, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K. A novel neurological mutant mouse, yotari, which exhibits reeler-like phenotype but expresses CR-50 antigen/reelin. *Neurosci Res*. 1997 Nov;29(3):217-23. doi: 10.1016/s0168-0102(97)00088-6. PMID: 9436647.
3. Yoshihara Y, Setsu T, Katsuyama Y, Kikkawa S, Terashima T, Maeda K. Cortical layer V neurons in the auditory and visual cortices of normal, reeler, and yotari mice. *Kobe J Med Sci*. 2010 Sep 28;56(2):E50-9. PMID: 21063146.
4. Lalonde R, Strazielle C. Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Res Rev*. 2011 Jun 24;67(1-2):252-9. doi: 10.1016/j.brainresrev.2011.02.005. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21356243
5. Jacquelin C, Strazielle C, Lalonde R. Neurologic function during developmental and adult stages in Dab1<sup>(scm)</sup> (scrambler) mutant mice. *Behav Brain Res*. 2012 Jan 1;226(1):265-73. doi: 10.1016/j.bbr.2011.09.020. Epub 2011 Sep 16. PMID: 21945093.
6. Perutina I, Kelam N, Maglica M, Racetin A, Ogorevc M, Filipović N, Katsuyama Y, Mišković J, Vukojević K. Disturbances in Switching between Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling Characterize Developing and Postnatal Kidneys of Dab1<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. *Biomedicines*. 2023 Apr 28;11(5):1321. doi: 10.3390/biomedicines11051321. PMID: 37238991; PMCID: PMC10215747.
7. Lesko J, Rastović P, Mišković J, Šoljić V, Paštar V, Zovko Z, Filipović N, Katsuyama Y, Saraga-Babić M, Vukojević K. The Interplay of Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, and Panx1 in Inner-Ear Development of Yotari (dab1<sup>-/-</sup>) Mice and Humans. *Biomedicines*. 2022 Mar 3;10(3):589. doi: 10.3390/biomedicines10030589. PMID: 35327391; PMCID: PMC8945117.
8. Wang ZW, Wang LP, Du Y, Liu Q. Mutations in NOTCH3 Gene may Promote the Clinical Presentation of Spinocerebellar Ataxia Type 37 Caused by Mutations in DAB1 Gene. *Front Mol Biosci*. 2021 Jun 16;8:668312. doi: 10.3389/fmolb.2021.668312. PMID: 34222332; PMCID: PMC8243652.

9. Gao H, Tao Y, He Q, Song F, Saffen D. Functional enrichment analysis of three Alzheimer's disease genome-wide association studies identifies DAB1 as a novel candidate liability/protective gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 7;463(4):490-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.044. Epub 2015 May 29. PMID: 26028559.
10. Nawa Y, Kimura H, Mori D, Kato H, Toyama M, Furuta S, Yu Y, Ishizuka K, Kushima I, Aleksic B, Arioka Y, Morikawa M, Okada T, Inada T, Kaibuchi K, Ikeda M, Iwata N, Suzuki M, Okahisa Y, Egawa J, Someya T, Nishimura F, Sasaki T, Ozaki N. Rare single-nucleotide DAB1 variants and their contribution to Schizophrenia and autism spectrum disorder susceptibility. *Hum Genome Var*. 2020 Nov 10;7(1):37. doi: 10.1038/s41439-020-00125-7. PMID: 33298905; PMCID: PMC7655853.
11. Li L, Hao J, Yan CQ, Wang HF, Meng B, Cai SY. Inhibition of microRNA-300 inhibits cell adhesion, migration, and invasion of prostate cancer cells by promoting the expression of DAB1. *Cell Cycle*. 2020 Nov;19(21):2793-2810. doi: 10.1080/15384101.2020.1823730. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33064976; PMCID: PMC7714426.
12. McAvoy S, Zhu Y, Perez DS, James CD, Smith DI. Disabled-1 is a large common fragile site gene, inactivated in multiple cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Feb;47(2):165-74. doi: 10.1002/gcc.20519. PMID: 18008369.
13. Cao RJ, Li K, Xing WY, Du S, Li Q, Zhu XJ, Cui SS. Disabled-1 is down-regulated in clinical breast cancer and regulates cell apoptosis through NF- $\kappa$ B/Bcl-2/caspase-9. *J Cell Mol Med*. 2019 Feb;23(2):1622-1627. doi: 10.1111/jcmm.14047. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30484953; PMCID: PMC6349202.
14. D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron*. 1999 Oct;24(2):471-9. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80860-0. PMID: 10571240.
15. Gao Z, Chen X, Zhu K, Zeng P, Ding G. Dab1 Contributes to Angiotensin II-Induced Apoptosis via p38 Signaling Pathway in Podocytes. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2484303. doi: 10.1155/2017/2484303. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28676854; PMCID: PMC5476836.
16. Racetin A, Jurić M, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Glavina Durdov M, Kunac N, Zekić Tomaš S, Saraga M, Šoljić V, Martinović V, Petričević J, Restović I, Lasić V, Kostić S, Kablar B, Watanabe K, Katsuyama Y, Saraga Babić M, Vukojević K. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development. *Croat Med J*. 2019 Dec 31;60(6):521-531. doi: 10.3325/cmj.2019.60.521. PMID: 31894918; PMCID: PMC6952895.

17. Racetin A, Filipović N, Lozić M, Ogata M, Gudelj Ensor L, Kelam N, Kovačević P, Watanabe K, Katsuyama Y, Saraga-Babić M, Glavina Durdov M, Vukojević K. A Homozygous *Dab1*<sup>-/-</sup> Is a Potential Novel Cause of Autosomal Recessive Congenital Anomalies of the Mice Kidney and Urinary Tract. *Biomolecules*. 2021 Apr 20;11(4):609. doi: 10.3390/biom11040609. PMID: 33924028; PMCID: PMC8073787.
18. Kelam N, Racetin A, Katsuyama Y, Vukojević K, Kostić S. Immunohistochemical Expression Pattern of FGFR1, FGFR2, RIP5, and HIP2 in Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 11;23(4):2025. doi: 10.3390/ijms23042025. PMID: 35216141; PMCID: PMC8879463.
19. Yosypiv IV. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a genetic disorder? *Int J Nephrol*. 2012;2012:909083. doi: 10.1155/2012/909083. Epub 2012 May 20. PMID: 22685656; PMCID: PMC3363415.
20. Stonebrook E, Hoff M, Spencer JD. Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: A Clinical Review. *Curr Treat Options Pediatr*. 2019;5(3):223-235. doi: 10.1007/s40746-019-00166-3. Epub 2019 Jun 11. PMID: 32864297; PMCID: PMC7451090.
21. Piscione TD, Rosenblum ND. The malformed kidney: disruption of glomerular and tubular development. *Clin Genet*. 1999 Nov;56(5):341-56. doi: 10.1034/j.1399-0004.1999.560502.x. PMID: 10668924.
22. Smith JM, Stablein DM, Munoz R, Hebert D, McDonald RA. Contributions of the Transplant Registry: The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS). *Pediatr Transplant*. 2007 Jun;11(4):366-73. doi: 10.1111/j.1399-3046.2007.00704.x. PMID: 17493215.
23. Queisser-Luft A, Stolz G, Wiesel A, Schlaefer K, Spranger J. Malformations in newborn: results based on 30,940 infants and fetuses from the Mainz congenital birth defect monitoring system (1990-1998). *Arch Gynecol Obstet*. 2002 Jul;266(3):163-7. doi: 10.1007/s00404-001-0265-4. PMID: 12197558.
24. Seikaly MG, Ho PL, Emmett L, Fine RN, Tejani A. Chronic renal insufficiency in children: the 2001 Annual Report of the NAPRTCS. *Pediatr Nephrol*. 2003 Aug;18(8):796-804. doi: 10.1007/s00467-003-1158-5. Epub 2003 Jun 14. PMID: 12811650.

25. Sanna-Cherchi S, Westland R, Ghiggeri GM, Gharavi AG. Genetic basis of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):4-15. doi: 10.1172/JCI95300. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29293093; PMCID: PMC5749511.
26. Weber S. Novel genetic aspects of congenital anomalies of kidney and urinary tract. *Curr Opin Pediatr*. 2012 Apr;24(2):212-8. doi: 10.1097/MOP.0b013e32834fdbd4. PMID: 22245908.
27. Harshman LA, Zepeda-Orozco D. Genetic Considerations in Pediatric Chronic Kidney Disease. *J Pediatr Genet*. 2016 Mar;5(1):43-50. doi: 10.1055/s-0035-1557111. Epub 2015 Aug 13. PMID: 27617141; PMCID: PMC4918706.
28. Song R, Yosypiv IV. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatr Nephrol*. 2011 Mar;26(3):353-64. doi: 10.1007/s00467-010-1629-4. Epub 2010 Aug 27. PMID: 20798957.
29. Rosendahl H. Ultrasound screening for fetal urinary tract malformations: a prospective study in general population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1990 Jul-Aug;36(1-2):27-33. doi: 10.1016/0028-2243(90)90046-4. PMID: 2194865.
30. Murugapoopathy V, Gupta IR. A Primer on Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tracts (CAKUT). *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020 May 7;15(5):723-731. doi: 10.2215/CJN.12581019. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32188635; PMCID: PMC7269211.
31. Gutierrez Guarnizo SA, Kellogg MK, Miller SC, Tikhonova EB, Karamysheva ZN, Karamyshev AL. Pathogenic signal peptide variants in the human genome. *NAR Genom Bioinform*. 2023 Oct 18;5(4):lqad093. doi: 10.1093/nargab/lqad093. PMID: 37859801; PMCID: PMC10583284.
32. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int*. 2016 Jan;89(1):58-67. doi: 10.1016/j.kint.2015.11.007. PMID: 26759048.
33. Luo S, Yang M, Zhao H, Han Y, Jiang N, Yang J, Chen W, Li C, Liu Y, Zhao C, Sun L. Caveolin-1 Regulates Cellular Metabolism: A Potential Therapeutic Target in Kidney Disease. *Front Pharmacol*. 2021 Dec 10;12:768100. doi: 10.3389/fphar.2021.768100. PMID: 34955837; PMCID: PMC8703113.
34. Ahmed T, Mythreye K, Lee NY. Strength and duration of GIPC-dependent signaling networks as determinants in cancer. *Neoplasia*. 2021 Feb;23(2):181-188. doi: 10.1016/j.neo.2020.12.004. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33360508; PMCID: PMC7773760.

35. Li Z, Li L, Zhang H, Zhou HJ, Ji W, Min W. Short AIP1 (ASK1-Interacting Protein-1) Isoform Localizes to the Mitochondria and Promotes Vascular Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Jan;40(1):112-127. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312976. Epub 2019 Oct 17. PMID: 31619063; PMCID: PMC7204498.
36. Kerjaschki D, Farquhar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Sep;79(18):5557-61. doi: 10.1073/pnas.79.18.5557. PMID: 6752952; PMCID: PMC346943.
37. Christensen EI, Gliemann J, Moestrup SK. Renal tubule gp330 is a calcium binding receptor for endocytic uptake of protein. *J Histochem Cytochem.* 1992 Oct;40(10):1481-90. doi: 10.1177/40.10.1382088. PMID: 1382088.
38. Chatelet F, Brianti E, Ronco P, Roland J, Verroust P. Ultrastructural localization by monoclonal antibodies of brush border antigens expressed by glomeruli. II. Extrarenal distribution. *Am J Pathol.* 1986 Mar;122(3):512-9. PMID: 3754090; PMCID: PMC1888215.
39. Christensen EI, Nielsen S, Moestrup SK, Borre C, Maunsbach AB, de Heer E, Ronco P, Hammond TG, Verroust P. Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Eur J Cell Biol.* 1995 Apr;66(4):349-64. PMID: 7656901.
40. Kerjaschki D, Farquhar MG. Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med.* 1983 Feb 1;157(2):667-86. doi: 10.1084/jem.157.2.667. PMID: 6337231; PMCID: PMC2186920.
41. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Apr;3(4):256-66. doi: 10.1038/nrm778. PMID: 11994745.
42. Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int.* 2006 Feb;69(3):440-9. doi: 10.1038/sj.ki.5000141. PMID: 16514429.
43. Oroojalian F, Rezayan AH, Mehrnejad F, Nia AH, Shier WT, Abnous K, Ramezani M. Efficient megalin targeted delivery to renal proximal tubular cells mediated by modified-polymyxin B-polyethylenimine based nano-gene-carriers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Oct 1;79:770-782. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.068. Epub 2017 May 14. PMID: 28629080.
44. Korenberg JR, Argraves KM, Chen XN, Tran H, Strickland DK, Argraves WS. Chromosomal localization of human genes for the LDL receptor family member glycoprotein 330 (LRP2) and its

associated protein RAP (LRPAP1). *Genomics*. 1994 Jul 1;22(1):88-93. doi: 10.1006/geno.1994.1348. PMID: 7959795.

45. Elsakka EGE, Mokhtar MM, Hegazy M, Ismail A, Doghish AS. Megalin, a multi-ligand endocytic receptor, and its participation in renal function and diseases: A review. *Life Sci*. 2022 Nov 1;308:120923. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120923. Epub 2022 Aug 29. PMID: 36049529.

46. Goto S, Hosojima M, Kabasawa H, Saito A. The endocytosis receptor megalin: From bench to bedside. *Int J Biochem Cell Biol*. 2023 Apr;157:106393. doi: 10.1016/j.biocel.2023.106393. Epub 2023 Feb 28. PMID: 36863658.

47. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D<sub>3</sub>. *Cell*. 1999 Feb 19;96(4):507-15. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80655-8. PMID: 10052453.

48. Christensen EI, Moskaug JO, Vorum H, Jacobsen C, Gundersen TE, Nykjaer A, Blomhoff R, Willnow TE, Moestrup SK. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Apr;10(4):685-95. doi: 10.1681/ASN.V104685. PMID: 10203351.

49. Moestrup SK, Cui S, Vorum H, Bregengård C, Bjørn SE, Norris K, Gliemann J, Christensen EI. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest*. 1995 Sep;96(3):1404-13. doi: 10.1172/JCI118176. PMID: 7544804; PMCID: PMC185763.

50. Hori Y, Aoki N, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, De S, Kabasawa H, Kaneko R, Aoki H, Tanabe Y, Kagamu H, Narita I, Kikuchi T, Saito A. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jun;28(6):1783-1791. doi: 10.1681/ASN.2016060606. Epub 2017 Jan 4. Erratum in: *J Am Soc Nephrol*. 2022 Apr;33(4):872. doi: 10.1681/ASN.2022010083. PMID: 28052987; PMCID: PMC5461786.

51. Humanes B, Lazaro A, Camano S, Moreno-Gordaliza E, Lazaro JA, Blanco-Codesido M, Lara JM, Ortiz A, Gomez-Gomez MM, Martín-Vasallo P, Tejedor A. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int*. 2012 Sep;82(6):652-63. doi: 10.1038/ki.2012.199. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22718191.

52. Pohl M, Kaminski H, Castrop H, Bader M, Himmerkus N, Bleich M, Bachmann S, Theilig F. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the

proximal nephron. *J Biol Chem*. 2010 Dec 31;285(53):41935-46. doi: 10.1074/jbc.M110.150284. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20966072; PMCID: PMC3009920.

53. Kuwahara S, Hosojima M, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, Sasagawa T, Kabasawa H, Kaseda R, Yasukawa R, Ishikawa T, Suzuki A, Sato H, Kageyama S, Tanaka T, Kitamura N, Narita I, Komatsu M, Nishiyama A, Saito A. Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Jul;27(7):1996-2008. doi: 10.1681/ASN.2015020190. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26534923; PMCID: PMC4926965.

54. Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8460-4. doi: 10.1073/pnas.93.16.8460. PMID: 8710893; PMCID: PMC38693.

55. Leheste JR, Melsen F, Wellner M, Jansen P, Schlichting U, Renner-Müller I, Andreassen TT, Wolf E, Bachmann S, Nykjaer A, Willnow TE. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J*. 2003 Feb;17(2):247-9. doi: 10.1096/fj.02-0578fje. Epub 2002 Dec 3. PMID: 12475886.

56. Christensen EI, Willnow TE. Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Oct;10(10):2224-36. doi: 10.1681/ASN.V10102224. PMID: 10505701.

57. Birn H, Vorum H, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Feb;11(2):191-202. doi: 10.1681/ASN.V112191. PMID: 10665926.

58. Fisher SE, van Bakel I, Lloyd SE, Pearce SH, Thakker RV, Craig IW. Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics*. 1995 Oct 10;29(3):598-606. doi: 10.1006/geno.1995.9960. PMID: 8575751.

59. Kantarci S, Al-Gazali L, Hill RS, Donnai D, Black GC, Bieth E, Chassaing N, Lacombe D, Devriendt K, Teebi A, Loscertales M, Robson C, Liu T, MacLaughlin DT, Noonan KM, Russell MK, Walsh CA, Donahoe PK, Pober BR. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet*. 2007 Aug;39(8):957-9. doi: 10.1038/ng2063. Epub 2007 Jul 15. PMID: 17632512; PMCID: PMC2891728.

60. Larsen C, Etzerodt A, Madsen M, Skjødt K, Moestrup SK, Andersen CBF. Structural assembly of the megadalton-sized receptor for intestinal vitamin B12 uptake and kidney protein reabsorption. *Nat Commun.* 2018 Dec 6;9(1):5204. doi: 10.1038/s41467-018-07468-4. PMID: 30523278; PMCID: PMC6283879.
61. Zou Z, Chung B, Nguyen T, Mentone S, Thomson B, Biemesderfer D. Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34302-10. doi: 10.1074/jbc.M405608200. Epub 2004 Jun 4. PMID: 15180987.
62. Seetharam B, Christensen EI, Moestrup SK, Hammond TG, Verroust PJ. Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J Clin Invest.* 1997 May 15;99(10):2317-22. doi: 10.1172/JCI119411. PMID: 9153271; PMCID: PMC508068.
63. Sahali D, Mulliez N, Chatelet F, Laurent-Winter C, Citadelle D, Roux C, Ronco P, Verroust P. Coexpression in humans by kidney and fetal envelopes of a 280 kDa-coated pit-restricted protein. Similarity with the murine target of teratogenic antibodies. *Am J Pathol.* 1992 Jan;140(1):33-44. PMID: 1731529; PMCID: PMC1886245.
64. Kalantry S, Manning S, Haub O, Tomihara-Newberger C, Lee HG, Fangman J, Distèche CM, Manova K, Lacy E. The amnionless gene, essential for mouse gastrulation, encodes a visceral-endoderm-specific protein with an extracellular cysteine-rich domain. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):412-6. doi: 10.1038/86912. PMID: 11279523.
65. Aminoff M, Carter JE, Chadwick RB, Johnson C, Gräsbeck R, Abdelaal MA, Broch H, Jenner LB, Verroust PJ, Moestrup SK, de la Chapelle A, Krahe R. Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat Genet.* 1999 Mar;21(3):309-13. doi: 10.1038/6831. PMID: 10080186.
66. Tanner SM, Aminoff M, Wright FA, Liyanarachchi S, Kuronen M, Saarinen A, Massika O, Mandel H, Broch H, de la Chapelle A. Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):426-9. doi: 10.1038/ng1098. Epub 2003 Feb 18. PMID: 12590260.
67. Broch H, Imerslund O, Monn E, Hovig T, Seip M. Imerslund-Gräsbeck anemia. A long-term follow-up study. *Acta Paediatr Scand.* 1984 Mar;73(2):248-53. doi: 10.1111/j.1651-2227.1984.tb09937.x. PMID: 6741523.



68. Wahlstedt-Fröberg V, Pettersson T, Aminoff M, Dugué B, Gräsbeck R. Proteinuria in cubilin-deficient patients with selective vitamin B12 malabsorption. *Pediatr Nephrol*. 2003 May;18(5):417-21. doi: 10.1007/s00467-003-1128-y. Epub 2003 Apr 5. PMID: 12687456.
69. Prabakaran T, Christensen EI, Nielsen R, Verroust PJ. Cubilin is expressed in rat and human glomerular podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Aug;27(8):3156-9. doi: 10.1093/ndt/gfr794. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22337902.
70. Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D, Pontillon F, Goda FO, Christensen EI, Hammond TG, Verroust PJ. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a megalin-binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5235-42. doi: 10.1074/jbc.273.9.5235. PMID: 9478979.
71. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyt O, Nexø E, Verroust PJ, Christensen EI, Kozyraki R. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov;21(11):1859-67. doi: 10.1681/ASN.2010050492. Epub 2010 Aug 26. PMID: 20798259; PMCID: PMC3014001.
72. Ahuja R, Yammani R, Bauer JA, Kalra S, Seetharam S, Seetharam B. Interactions of cubilin with megalin and the product of the amnionless gene (AMN): effect on its stability. *Biochem J*. 2008 Mar 1;410(2):301-8. doi: 10.1042/BJ20070919. PMID: 17990981.
73. Christensen EI, Birn H, Storm T, Weyer K, Nielsen R. Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiology (Bethesda)*. 2012 Aug;27(4):223-36. doi: 10.1152/physiol.00022.2012. PMID: 22875453.
74. Reznichenko A, Snieder H, van den Born J, de Borst MH, Damman J, van Dijk MC, van Goor H, Hepkema BG, Hillebrands JL, Leuvenink HG, Niesing J, Bakker SJ, Seelen M, Navis G; REGaTTA (REnal GeneTics TrAnsplantation) Groningen group. CUBN as a novel locus for end-stage renal disease: insights from renal transplantation. *PLoS One*. 2012;7(5):e36512. doi: 10.1371/journal.pone.0036512. Epub 2012 May 4. PMID: 22574174; PMCID: PMC3344899.
75. Böger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Köttgen A, de Boer IH, Fuchsberger C, O'Seaghdha CM, Pattaro C, Teumer A, Liu CT, Glazer NL, Li M, O'Connell JR, Tanaka T, Peralta CA, Kutalik Z, Luan J, Zhao JH, Hwang SJ, Akylbekova E, Kramer H, van der Harst P, Smith AV, Lohman K, de Andrade M, Hayward C, Kollerits B, Tönjes A, Aspelund T, Ingelsson E, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Shuldiner AR, Mitchell BD, Arking DE, Franceschini N, Boerwinkle E, Egan J,

Hernandez D, Reilly M, Townsend RR, Lumley T, Siscovick DS, Psaty BM, Kestenbaum B, Haritunians T, Bergmann S, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Waterworth D, Johnson AD, Florez JC, Meigs JB, Lu X, Turner ST, Atkinson EJ, Leak TS, Aasarød K, Skorpen F, Syvänen AC, Illig T, Baumert J, Koenig W, Krämer BK, Devuyst O, Mychaleckyj JC, Minelli C, Bakker SJ, Kedenko L, Paulweber B, Coassin S, Endlich K, Kroemer HK, Biffar R, Stracke S, Völzke H, Stumvoll M, Mägi R, Campbell H, Vitart V, Hastie ND, Gudnason V, Kardina SL, Liu Y, Polasek O, Curhan G, Kronenberg F, Prokopenko I, Rudan I, Arnlöv J, Hallan S, Navis G; CKDGen Consortium; Parsa A, Ferrucci L, Coresh J, Shlipak MG, Bull SB, Paterson NJ, Wichmann HE, Wareham NJ, Loos RJ, Rotter JJ, Pramstaller PP, Cupples LA, Beckmann JS, Yang Q, Heid IM, Rettig R, Dreisbach AW, Bochud M, Fox CS, Kao WH. CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Mar;22(3):555-70. doi: 10.1681/ASN.2010060598. PMID: 21355061; PMCID: PMC3060449.

76. Glenney JR Jr. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20163-6. PMID: 2479645.

77. Engelman JA, Zhang XL, Galbiati F, Lisanti MP. Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3). Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett*. 1998 Jun 16;429(3):330-6. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00619-x. PMID: 9662443.

78. Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci*. 2000 Oct;113 Pt 19:3509-17. doi: 10.1242/jcs.113.19.3509. PMID: 10984441.

79. Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol*. 2004;5(3):214. doi: 10.1186/gb-2004-5-3-214. Epub 2004 Mar 1. PMID: 15003112; PMCID: PMC395759.

80. Filippini A, D'Alessio A. Caveolae and Lipid Rafts in Endothelium: Valuable Organelles for Multiple Functions. *Biomolecules*. 2020 Aug 21;10(9):1218. doi: 10.3390/biom10091218. PMID: 32825713; PMCID: PMC7563503.

81. Root KT, Plucinsky SM, Glover KJ. Recent progress in the topology, structure, and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae. *Curr Top Membr*. 2015;75:305-36. doi: 10.1016/bs.ctm.2015.03.007. Epub 2015 Apr 11. PMID: 26015287.

82. Wong TH, Dickson FH, Timmins LR, Nabi IR. Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Jun;39(2):455-469. doi: 10.1007/s10555-020-09892-9. PMID: 32440845.

83. Parton RG, Tillu VA, Collins BM. Caveolae. *Curr Biol.* 2018 Apr 23;28(8):R402-R405. doi: 10.1016/j.cub.2017.11.075. PMID: 29689223.
84. Campos A, Burgos-Ravanel R, González MF, Huilcaman R, Lobos González L, Quest AFG. Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis. *Biomolecules.* 2019 Jul 29;9(8):314. doi: 10.3390/biom9080314. PMID: 31362353; PMCID: PMC6723107.
85. Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer Metastasis Rev.* 2020 Jun;39(2):397-414. doi: 10.1007/s10555-020-09875-w. PMID: 32279119; PMCID: PMC7890422.
86. Fiala GJ, Minguet S. Caveolin-1: The Unnoticed Player in TCR and BCR Signaling. *Adv Immunol.* 2018;137:83-133. doi: 10.1016/bs.ai.2017.12.002. Epub 2018 Feb 13. PMID: 29455848.
87. Janković J, Tatić S, Božić V, Živaljević V, Cvejić D, Paskaš S. Inverse expression of caveolin-1 and EGFR in thyroid cancer patients. *Hum Pathol.* 2017 Mar;61:164-172. doi: 10.1016/j.humpath.2016.10.020. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27818286.
88. Oliveira SDS, Castellon M, Chen J, Bonini MG, Gu X, Elliott MH, Machado RF, Minshall RD. Inflammation-induced caveolin-1 and BMPRII depletion promotes endothelial dysfunction and TGF- $\beta$ -driven pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017 May 1;312(5):L760-L771. doi: 10.1152/ajplung.00484.2016. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28188225; PMCID: PMC5451590.
89. Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol.* 2014 Apr;41(2):195-216. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.03.002. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24787293.
90. Shiroto T, Romero N, Sugiyama T, Sartoretto JL, Kalwa H, Yan Z, Shimokawa H, Michel T. Caveolin-1 is a critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascular endothelium. *PLoS One.* 2014 Feb 3;9(2):e87871. doi: 10.1371/journal.pone.0087871. PMID: 24498385; PMCID: PMC3912129.
91. Hart PC, Ratti BA, Mao M, Ansenberger-Fricano K, Shajahan-Haq AN, Tyner AL, Minshall RD, Bonini MG. Caveolin-1 regulates cancer cell metabolism via scavenging Nrf2 and suppressing MnSOD-driven glycolysis. *Oncotarget.* 2016 Jan 5;7(1):308-22. doi: 10.18632/oncotarget.5687. PMID: 26543228; PMCID: PMC4808000.

92. Nwosu ZC, Ebert MP, Dooley S, Meyer C. Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective. *Mol Cancer*. 2016 Nov 16;15(1):71. doi: 10.1186/s12943-016-0558-7. PMID: 27852311; PMCID: PMC5112640.
93. Gopu V, Fan L, Shetty RS, Nagaraja MR, Shetty S. Caveolin-1 scaffolding domain peptide regulates glucose metabolism in lung fibrosis. *JCI Insight*. 2020 Oct 2;5(19):e137969. doi: 10.1172/jci.insight.137969. PMID: 32841217; PMCID: PMC7566714.
94. Chen ZH, Cao JF, Zhou JS, Liu H, Che LQ, Mizumura K, Li W, Choi AM, Shen HH. Interaction of caveolin-1 with ATG12-ATG5 system suppresses autophagy in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jun 1;306(11):L1016-25. doi: 10.1152/ajplung.00268.2013. Epub 2014 Apr 11. Erratum in: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018 Nov 1;315(5):L920. doi: 10.1152/ajplung.zh5-7548-corr.2018. PMID: 24727585; PMCID: PMC4747911.
95. Bai X, Yang X, Jia X, Rong Y, Chen L, Zeng T, Deng X, Li W, Wu G, Wang L, Li Y, Zhang J, Xiong Z, Xiong L, Wang Y, Zhu L, Zhao Y, Jin S. CAV1-CAVIN1-LC3B-mediated autophagy regulates high glucose-stimulated LDL transcytosis. *Autophagy*. 2020 Jun;16(6):1111-1129. doi: 10.1080/15548627.2019.1659613. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31448673; PMCID: PMC7469686.
96. Liu A, Wu Q, Guo J, Ares I, Rodríguez JL, Martínez-Larrañaga MR, Yuan Z, Anadón A, Wang X, Martínez MA. Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions. *Pharmacol Ther*. 2019 Mar;195:54-84. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.004. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30321555.
97. Zager RA, Johnson A, Hanson S, dela Rosa V. Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure. *Kidney Int*. 2002 May;61(5):1674-83. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00316.x. PMID: 11967017.
98. Gvaramia D, Blaauboer ME, Hanemaaijer R, Everts V. Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. *Matrix Biol*. 2013 Aug 8;32(6):307-15. doi: 10.1016/j.matbio.2013.03.005. Epub 2013 Apr 11. PMID: 23583521.
99. Shihata WA, Putra MRA, Chin-Dusting JPF. Is There a Potential Therapeutic Role for Caveolin-1 in Fibrosis? *Front Pharmacol*. 2017 Aug 24;8:567. doi: 10.3389/fphar.2017.00567. PMID: 28970796; PMCID: PMC5609631.

100. Van Krieken R, Krepinsky JC. Caveolin-1 in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy: Potential Therapeutic Target? *Curr Diab Rep*. 2017 Mar;17(3):19. doi: 10.1007/s11892-017-0844-9. PMID: 28283950.
101. Wettersten HI, Aboud OA, Lara PN Jr, Weiss RH. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol*. 2017 Jul;13(7):410-419. doi: 10.1038/nrneph.2017.59. Epub 2017 May 8. PMID: 28480903.
102. Wang S, Wang N, Zheng Y, Yang B, Liu P, Zhang F, Li M, Song J, Chang X, Wang Z. Caveolin-1 inhibits breast cancer stem cells via c-Myc-mediated metabolic reprogramming. *Cell Death Dis*. 2020 Jun 11;11(6):450. doi: 10.1038/s41419-020-2667-x. PMID: 32528105; PMCID: PMC7290025.
103. Steffens S, Schrader AJ, Blasig H, Vetter G, Eggers H, Tränkenschuh W, Kuczyk MA, Serth J. Caveolin 1 protein expression in renal cell carcinoma predicts survival. *BMC Urol*. 2011 Dec 7;11:25. doi: 10.1186/1471-2490-11-25. PMID: 22152020; PMCID: PMC3266190.
104. Gao Y, Li M, Chen W, Simons M. Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol*. 2000 Sep;184(3):373-9. doi: 10.1002/1097-4652(200009)184:3<373::AID-JCP12>3.0.CO;2-I. PMID: 10911369.
105. De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farquhar MG. GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 13;95(21):12340-5. doi: 10.1073/pnas.95.21.12340. PMID: 9770488; PMCID: PMC22833.
106. Salama O, Herrmann S, Tziknovsky A, Piura B, Meirovich M, Trakht I, Reed B, Lobel LI, Marks RS. Chemiluminescent optical fiber immunosensor for detection of autoantibodies to ovarian and breast cancer-associated antigens. *Biosens Bioelectron*. 2007 Feb 15;22(7):1508-16. doi: 10.1016/j.bios.2006.07.003. Epub 2006 Aug 9. PMID: 16904309.
107. Rudchenko S, Scanlan M, Kalantarov G, Yavelovsky V, Levy C, Estabrook A, Old L, Chan GL, Lobel L, Trakht I. A human monoclonal autoantibody to breast cancer identifies the PDZ domain containing protein GIPC1 as a novel breast cancer-associated antigen. *BMC Cancer*. 2008 Aug 24;8:248. doi: 10.1186/1471-2407-8-248. PMID: 18721486; PMCID: PMC2529336.
108. Muders MH, Dutta SK, Wang L, Lau JS, Bhattacharya R, Smyrk TC, Chari ST, Datta K, Mukhopadhyay D. Expression and regulatory role of GAIP-interacting protein GIPC in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10264-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2321. PMID: 17079444.

109. Chittenden TW, Pak J, Rubio R, Cheng H, Holton K, Prendergast N, Glinskii V, Cai Y, Culhane A, Bentink S, Schwede M, Mar JC, Howe EA, Aryee M, Sultana R, Lanahan AA, Taylor JM, Holmes C, Hahn WC, Zhao JJ, Iglehart JD, Quackenbush J. Therapeutic implications of GIPC1 silencing in cancer. *PLoS One*. 2010 Dec 30;5(12):e15581. doi: 10.1371/journal.pone.0015581. PMID: 21209904; PMCID: PMC3012716.
110. Yoshida A, Shimizu A, Asano H, Kadonosono T, Kondoh SK, Geretti E, Mammoto A, Klagsbrun M, Seo MK. VEGF-A/NRP1 stimulates GIPC1 and Syx complex formation to promote RhoA activation and proliferation in skin cancer cells. *Biol Open*. 2015 Jul 24;4(9):1063-76. doi: 10.1242/bio.010918. PMID: 26209534; PMCID: PMC4582117.
111. Mikhaïlenko DS, Liubchenko LN, Zborovskaia IB, Strel'nikov VV, Zaletaev DV. [Analysis of polymorphic variants of gene GIPC1 CGG repeats in healthy individuals and in patients with breast cancer and non-small cell lung cancer]. *Genetika*. 2005 Sep;41(9):1289-93. Russian. PMID: 16240642.
112. Kirikoshi H, Katoh M. Expression of human GIPC1 in normal tissues, cancer cell lines, and primary tumors. *Int J Mol Med*. 2002 May;9(5):509-13. PMID: 11956658.
113. Favre-Bonvin A, Reynaud C, Kretz-Remy C, Jalinot P. Human papillomavirus type 18 E6 protein binds the cellular PDZ protein TIP-2/GIPC, which is involved in transforming growth factor beta signaling and triggers its degradation by the proteasome. *J Virol*. 2005 Apr;79(7):4229-37. doi: 10.1128/JVI.79.7.4229-4237.2005. PMID: 15767424; PMCID: PMC1061528.
114. Zhang Z, Zhou Q, Liu R, Liu L, Shen WJ, Azhar S, Qu YF, Guo Z, Hu Z. The adaptor protein GIPC1 stabilizes the scavenger receptor SR-B1 and increases its cholesterol uptake. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100616. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100616. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33811857; PMCID: PMC8093464.
115. Fan Y, Shen S, Yang J, Yao D, Li M, Mao C, Wang Y, Hao X, Ma D, Li J, Shi J, Guo M, Li S, Yuan Y, Liu F, Yang Z, Zhang S, Hu Z, Fan L, Liu H, Zhang C, Wang Y, Wang Q, Zheng H, He Y, Song B, Xu Y, Shi C. GIPC1 CGG Repeat Expansion Is Associated with Movement Disorders. *Ann Neurol*. 2022 May;91(5):704-715. doi: 10.1002/ana.26325. Epub 2022 Mar 8. PMID: 35152460.
116. Cao H, Zhang J, Wang W. DAB2IP Plays Important Clinical Significance and Correlates With Immune Infiltration in Renal Cell Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2020 Jan-Dec;19:1533033820936682. doi: 10.1177/1533033820936682. PMID: 32583730; PMCID: PMC7493279.

117. Chen H, Pong RC, Wang Z, Hsieh JT. Differential regulation of the human gene DAB2IP in normal and malignant prostatic epithelia: cloning and characterization. *Genomics*. 2002 Apr;79(4):573-81. doi: 10.1006/geno.2002.6739. PMID: 11944990.
118. Mok SC, Chan WY, Wong KK, Cheung KK, Lau CC, Ng SW, Baldini A, Colitti CV, Rock CO, Berkowitz RS. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 1998 May 7;16(18):2381-7. doi: 10.1038/sj.onc.1201769. PMID: 9620555.
119. Zhou J, Scholes J, Hsieh JT. Signal transduction targets in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20(3-4):351-62. doi: 10.1023/a:1015504015302. PMID: 12085971.
120. Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, Yano M, Ouchida M, Doihara H, Suzuki M, Chen H, Hsieh JT, Gazdar AF, Shimizu N. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15;10(6):2082-9. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0236. PMID: 15041729.
121. Fulop V, Colitti CV, Genest D, Berkowitz RS, Yiu GK, Ng SW, Szepesi J, Mok SC. DOC-2/hDab2, a candidate tumor suppressor gene involved in the development of gestational trophoblastic diseases. *Oncogene*. 1998 Jul 30;17(4):419-24. doi: 10.1038/sj.onc.1201955. PMID: 9696034.
122. Zhang X, Li N, Li X, Zhao W, Qiao Y, Liang L, Ding Y. Low expression of DAB2IP contributes to malignant development and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Jun;27(6):1117-25. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07049.x. PMID: 22168621.
123. Wiley JW, Higgins GA, Hong S. Chronic psychological stress alters gene expression in rat colon epithelial cells promoting chromatin remodeling, barrier dysfunction and inflammation. *PeerJ*. 2022 Apr 29;10:e13287. doi: 10.7717/peerj.13287. PMID: 35509963; PMCID: PMC9059753.
124. Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries JP, Kranendonk SE, Zeebregts CJ, van Sterkenburg SM, Geelkerken RH, van Rij AM, Williams MJ, Boll AP, Kostic JP, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Walters GB, Masson G, Sulem P, Saemundsdottir J, Mouy M, Magnusson KP, Tromp G, Elmore JR, Sakalihan N, Limet R, Defraigne JO, Ferrell RE, Ronkainen A, Ruigrok YM, Wijmenga C, Grobbee DE, Shah SH, Granger CB, Quyyumi AA, Vaccarino V, Patel RS, Zafari AM, Levey AI, Austin H, Girelli D, Pignatti PF, Olivieri O, Martinelli N, Malerba G, Trabetti E, Becker LC, Becker DM, Reilly MP, Rader DJ, Mueller T, Dieplinger B, Haltmayer M, Urbonavicius S, Lindblad B, Gottsäter A, Gaetani E, Pola R, Wells P, Rodger M, Forgie M, Langlois N, Corral J, Vicente V, Fontcuberta J, España F, Grarup N, Jørgensen T, Witte DR, Hansen T,

Pedersen O, Aben KK, de Graaf J, Holewijn S, Folkersen L, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Collier DA, Stefansson H, Steinthorsdottir V, Rafnar T, Valdimarsson EM, Magnadottir HB, Sveinbjornsdottir S, Olafsson I, Magnusson MK, Palmason R, Haraldsdottir V, Andersen K, Onundarson PT, Thorgeirsson G, Kiemeny LA, Powell JT, Carey DJ, Kuivaniemi H, Lindholt JS, Jones GT, Kong A, Blankensteijn JD, Matthiasson SE, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010 Aug;42(8):692-7. doi: 10.1038/ng.622. Epub 2010 Jul 11. PMID: 20622881; PMCID: PMC4157066.

125. Qiao S, Kim SH, Heck D, Goldowitz D, LeDoux MS, Homayouni R. Dab2IP GTPase activating protein regulates dendrite development and synapse number in cerebellum. *PLoS One.* 2013;8(1):e53635. doi: 10.1371/journal.pone.0053635. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23326475; PMCID: PMC3541190.

126. Zhang R, He X, Liu W, Lu M, Hsieh JT, Min W. AIP1 mediates TNF-alpha-induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3. *J Clin Invest.* 2003 Jun;111(12):1933-43. doi: 10.1172/JCI17790. PMID: 12813029; PMCID: PMC161425.

127. Zhang H, He Y, Dai S, Xu Z, Luo Y, Wan T, Luo D, Jones D, Tang S, Chen H, Sessa WC, Min W. AIP1 functions as an endogenous inhibitor of VEGFR2-mediated signaling and inflammatory angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):3904-16. doi: 10.1172/JCI36168. Epub 2008 Nov 3. PMID: 19033661; PMCID: PMC2575835.

128. Yu L, Qin L, Zhang H, He Y, Chen H, Pober JS, Tellides G, Min W. AIP1 prevents graft arteriosclerosis by inhibiting interferon- $\gamma$ -dependent smooth muscle cell proliferation and intimal expansion. *Circ Res.* 2011 Aug 5;109(4):418-27. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.248245. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21700930; PMCID: PMC3227522.

129. De Florian Fania R, Bellazzo A, Collavin L. An update on the tumor-suppressive functions of the RasGAP protein DAB2IP with focus on therapeutic implications. *Cell Death Differ.* 2024 Jul;31(7):844-854. doi: 10.1038/s41418-024-01332-3. Epub 2024 Jun 20. PMID: 38902547; PMCID: PMC11239834.

130. Yan KS, Kuti M, Zhou MM. PTB or not PTB -- that is the question. *FEBS Lett.* 2002 Feb 20;513(1):67-70. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03305-1. PMID: 11911882.

131. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by



mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*. 2001 May 18;292(5520):1394-8. doi: 10.1126/science.1060458. Epub 2001 Apr 26. PMID: 11326085.

132. Nagai M, Meerloo T, Takeda T, Farquhar MG. The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol Biol Cell*. 2003 Dec;14(12):4984-96. doi: 10.1091/mbc.e03-06-0385. Epub 2003 Oct 3. PMID: 14528014; PMCID: PMC284800.

133. Chu PY, Quigley R, Babich V, Huang CL. Dietary potassium restriction stimulates endocytosis of ROMK channel in rat cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec;285(6):F1179-87. doi: 10.1152/ajprenal.00150.2003. Epub 2003 Sep 2. PMID: 12952855.

134. Fang L, Garuti R, Kim BY, Wade JB, Welling PA. The ARH adaptor protein regulates endocytosis of the ROMK potassium secretory channel in mouse kidney. *J Clin Invest*. 2009 Nov;119(11):3278-89. doi: 10.1172/JCI37950. Epub 2009 Oct 19. PMID: 19841541; PMCID: PMC2769171.

135. De S, Kuwahara S, Saito A. The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes (Basel)*. 2014 Jul 11;4(3):333-55. doi: 10.3390/membranes4030333. PMID: 25019425; PMCID: PMC4194038.

136. Cicchetti DV. Multiple comparison methods: establishing guidelines for their valid application in neuropsychological research. *J Clin Exp Neuropsychol*. 1994 Feb;16(1):155-61. doi: 10.1080/01688639408402625. PMID: 8150886.

137. Robert J.A., Orson W.M., Michael Caplan S. *Giebisch's the Kidney*. 5th ed. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2013. pp. 3215–3278.

138. Maglica M, Kelam N, Haque E, Perutina I, Racetin A, Filipović N, Katsuyama Y, Vukojević K. Immunoexpression Pattern of Autophagy Markers in Developing and Postnatal Kidneys of *Dab1*<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. *Biomolecules*. 2023 Feb 21;13(3):402. doi: 10.3390/biom13030402. PMID: 36979337; PMCID: PMC10046325.

139. Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Orskov H, Willnow TE, Moestrup SK, Christensen EI. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest*. 2000 May;105(10):1353-61. doi: 10.1172/JCI8862. PMID: 10811843; PMCID: PMC315466.

140. Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S, Ichikawa I. Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int*.

2008 Nov;74(10):1262-9. doi: 10.1038/ki.2008.405. Epub 2008 Sep 3. PMID: 18769366; PMCID: PMC2615689.

141. Tan VP, Miyamoto S. HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy*. 2015;11(6):963-4. doi: 10.1080/15548627.2015.1042195. PMID: 26075878; PMCID: PMC4502787.

142. Grayson PC, Eddy S, Taroni JN, Lightfoot YL, Mariani L, Parikh H, Lindenmeyer MT, Ju W, Greene CS, Godfrey B, Cohen CD, Krischer J, Kretzler M, Merkel PA; Vasculitis Clinical Research Consortium, the European Renal cDNA Bank cohort, and the Nephrotic Syndrome Study Network. Metabolic pathways and immunometabolism in rare kidney diseases. *Ann Rheum Dis*. 2018 Aug;77(8):1226-1233. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212935. Epub 2018 May 3. PMID: 29724730; PMCID: PMC6045442.

143. Bhattacharya S, Pal K, Sharma AK, Dutta SK, Lau JS, Yan IK, Wang E, Elkhanany A, Alkharfy KM, Sanyal A, Patel TC, Chari ST, Spaller MR, Mukhopadhyay D. GAIP interacting protein C-terminus regulates autophagy and exosome biogenesis of pancreatic cancer through metabolic pathways. *PLoS One*. 2014 Dec 3;9(12):e114409. doi: 10.1371/journal.pone.0114409. PMID: 25469510; PMCID: PMC4255029.

144. Lou X, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. GAIP, GIPC and Galphai3 are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Apr;13(4):918-927. doi: 10.1681/ASN.V134918. PMID: 11912251.

145. Wang Z, Tseng CP, Pong RC, Chen H, McConnell JD, Navone N, Hsieh JT. The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with N-terminal domain of DOC-2/DAB2. *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12622-31. doi: 10.1074/jbc.M110568200. Epub 2002 Jan 25. PMID: 11812785.

146. Liu L, Xu C, Hsieh JT, Gong J, Xie D. DAB2IP in cancer. *Oncotarget*. 2016 Jan 26;7(4):3766-76. doi: 10.18632/oncotarget.6501. PMID: 26658103; PMCID: PMC4826168.

147. Xing Y, Wen Z, Gao W, Lin Z, Zhong J, Jiu Y. Multifaceted Functions of Host Cell Caveolae/Caveolin-1 in Virus Infections. *Viruses*. 2020 Apr 26;12(5):487. doi: 10.3390/v12050487. PMID: 32357558; PMCID: PMC7291293.

148. Dai X, North BJ, Inuzuka H. Negative regulation of DAB2IP by Akt and SCFFbw7 pathways. *Oncotarget*. 2014 May 30;5(10):3307-15. doi: 10.18632/oncotarget.1939. PMID: 24912918; PMCID: PMC4102811.
149. He G, Gupta S, Yi M, Michaely P, Hobbs HH, Cohen JC. ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):44044-9. doi: 10.1074/jbc.M208539200. Epub 2002 Sep 8. PMID: 12221107.
150. Lehtonen S, Shah M, Nielsen R, Iino N, Ryan JJ, Zhou H, Farquhar MG. The endocytic adaptor protein ARH associates with motor and centrosomal proteins and is involved in centrosome assembly and cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 2008 Jul;19(7):2949-61. doi: 10.1091/mbc.e07-05-0521. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18417616; PMCID: PMC2441659.
151. Schatten H, Sun QY. The significant role of centrosomes in stem cell division and differentiation. *Microsc Microanal*. 2011 Aug;17(4):506-12. doi: 10.1017/S1431927611000018. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21740616.

## **8. SAŽETAK**

**Uvod:** *Yotari* (*yot*) miševi su karakterizirani mutacijom DAB1 gena s abnormalnostima središnjeg živčanog sustava. Specifični su po nestabilnom hodu, tremoru i postnatalnoj smrti. Dosadašnja istraživanja su dokazala kako imaju izraženu hipoplaziju bubrega što spada u grupu razvojnih abnormalnosti bubrega i mokraćnih puteva (*eng.* CAKUT). Također, otkriveno je kako su im poravnate nožice u glomerulu bubrega s gubitkom funkcionalnog tkiva bubrega i posljedičnoj preranoj smrti. U ovoj studiji se htjelo istražiti različite vezajuće transportne proteine i njihovu ulogu u funkciji bubrega. Točnije, imunoekspresiju Megalina, Cubilina, Caveolina-1, Gipc1 i Dab2IP u embrionalnom (E) i postnatalnom (P) razvoju mišjeg bubrega s fokusom na različite obrasce između divljeg tipa i *yotari* Dab1<sup>-/-</sup> (*yot*) miševa.

**Metode i materijali:** Ispitanici su Dab1<sup>-/-</sup> (*yotari*) i divljeg tipa miševi žrtvovani gestacijskog dana E13.5 i E15.5. Također, miševi su žrtvovani postnatalnog 4. i 14. dana. Nakon pripreme i prikupljanja uzoraka tkiva bubrega, urađena je histološka analiza uz hematoksilin-eozin bojanje. Uz primjenu primarnih i sekundarnih protutijela, učinjeno je imunofluorescencijsko bojanje uzoraka. Mikroskopiranjem i mikrofotografijama je određena tkivna raspodjela i jačina signala proteina.

**Rezultati:** Imunofluorescencija otkrila je povećanu imunoekspresiju receptora Megalina i Cubilina u ampuli/sabirnim kanalićima i zavijenim tubulima u svim razvojnim fazama s najizraženijom imunoekspresijom uočenom u zavijenim tubulima i parijetalnom epitelu Bowmanove čahure. Kvantitativna analiza pokazala je veći postotak Megalina i Cubilina kod divljeg tipa usporedno s *yot* miševima na E13.5. Koekspresija Megalina i Cubilina opažena je na apikalnoj membrani zavijenih tubula i parijetalnom sloju Bowmanove kapsule. Intenzitet bojenja Megalina varirao je u različitim razvojnim fazama s najjačom reaktivnošću uočenom na ampuli i sabirnim kanalićima na dan embrija (E13.5) u wt miševa. Nasuprot tome, Caveolin-1 pokazao je visoku imunoekspresiju u metanefričkom mezenhimu, krvnim žilama i graničnom području između metanefričkog mezenhima i bubrežnih mjehurića sa smanjenjem imunoekspresije kako je razvoj napredovao. Gipc1 je pokazao difuzno citoplazmatsko bojenje u metanefričkom mezenhimu, zavijenim tubulima i sabirnim kanalićima, sa značajnim razlikama u imunoekspresiji između divljeg tipa i *yot* miševa u obje istraživane embrionalne vremenske točke. Imunofluorescentno bojenje Dab2IP bilo je najizraženije u bubrežnim vezikulama/glomerulima i ampuli/sabirnim kanalima na E13.5, s blagim intenzitetom bojenja uočenim u distalnim zavijenim tubulima postnatalno.

**Zaključak:** Naši rezultati razjašnjavaju različitu imunoekspresiju uzoraka i potencijalnih dijelova ovih proteina u razvoju i funkciji bubrega, naglašavajući važnost daljnjeg istraživanja njihovih regulatornih mehanizama.

## **9. SUMMARY**

## **Immunoexpression Patterns of Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 and Dab2IP in the Embryonic and Postnatal Development of the Kidneys in Yotari (Dab1<sup>-/-</sup>) Mice**

**Introduction:** In this study, we wanted to examine the immunoexpression patterns of transport proteins Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1, and Dab2IP in embryonic (E) and postnatal (P) mouse kidney development with a focus on different patterns between wild type and *yotari* Dab1<sup>-/-</sup> mice.

**Materials and methods:** Sample collection were Dab1<sup>-/-</sup> (*yotari*) and wild type mice sacrificed on gestational day (E13.5, E15.5) and postnatally (P4, P14). Histological analysis was done with hematoxylin-eosin staining. With the use of primary and secondary antibodies, immunofluorescence staining was also performed.

**Results:** Immunofluorescence revealed raised immunoexpression of receptors Megalin and Cubilin at the ampulla/collecting ducts and convoluted tubules across all developmental stages. Caveolin-1 exhibited high immunoexpression in the metanephric mesenchyme, blood vessels with a decrease in immunoexpression as development progressed. Gipc1 showed diffuse cytoplasmic staining in metanephric mesenchyme, convoluted tubules and collecting ducts, with significant differences in immunoexpression between wild type and *yot* mice. Dab2IP was most prominent in renal vesicle/glomeruli and ampulla/collecting ducts at E13.5, with mild staining intensity observed in the distal convoluted tubules postnatally.

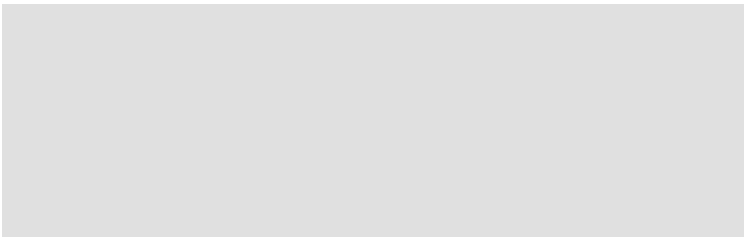
**Conclusion:** Our findings elucidate distinct immunoexpression of patterns and potential parts of these proteins in the development and function of the kidney, highlighting the importance of further investigation into their regulatory mechanisms.

## **10. ŽIVOTOPIS**



## **OSOBNI PODATCI**

**Ime i prezime:** Sani Žužul



**Državljanstvo:** Hrvatsko

**Datum i mjesto rođenja:** 09. 09. 1985. g., Split

**Područje rada:** specijalist vaskularne kirurgije, dr. med.

### **Radno iskustvo**

09/2018. → Specijalist vaskularne kirurgije, dr. med.

Zavod za torakalnu i vaskularnu kirurgiju; Odjel za vaskularnu kirurgiju

KBC Split

Spinčićeva 1, 21000 Split

04/2013. - 08/2018. → Specijalizant vaskularne kirurgije, dr. med.

Klinika za kirurgiju

KBC Split

Spinčićeva 1, 21000 Split

04/2013. - 08/2018. → liječnica primarne medicine (dr. med.) u timu hitne pomoći

Zavod za hitnu medicinu Šibensko-kninske županije

Karla Vipauca 8, 22000 Šibenik

12/2012. → Liječnica primarne medicine (dr. med.), zamjena u obiteljskoj medicini

Ambulanta dr. Korine Runtić Vukadin

Bana J. Jelačića 23, 21223 Okrug Gornji, Čiovo

06/2012. - 09/2012. → Liječnica primarne medicine (dr. med.), turistička ambulanta

Bana J. Jelačića 23, 21223 Okrug Gornji, Čiovo

11/2011. - 03/2012. → dr. med.– zamjenica ravnateljice Ustanove za medicinsku njegu i fizikalnu terapiju u kući „Vita“

Mišina 28, 21000 Split

10/2010. - 10/2011. → dr. med. – stažist (pripravnik)

KBC Split

Spinčićeva 1, 21000 Split

### **Obrazovanje i osposobljavanje**

04/2021. - Predavanje „Na vrijeme spriječiti ili kirurški liječiti“

03/2021. - Predavanje „Kronična venska bolest - od nastanka do progresije“

03/2021. - Predavanje „Kronična venska insuficijencija“

03/2021. - Predavanje „Specifična nutritivna intervencija kod otežanog cijeljenja rana“

12/2020. - Predavanje „Periferna arterijska bolest - prikaz slučajeva“

10/2020. - Sudjelovanje na radnome sastanku „Klinička nutricija u vaskularnoj kirurgiji“

04/2020. - Sudjelovanje na sastanku „Klinička nutricija u kirurgiji“, Motovun

02/2020. - Sudjelovanje na tečaju „Treatment of chronic wounds, lymphedema and lipedema“, Crikvenica

10/2019. - Simpozij „Potkoljениčni vrijedovi“, predavač „Osvrt na sve vrste vrijedova“, Trogir

05/2019. - Sudjelovanje na 11. OktaEduka s predavanjem „Kronična venska bolest“, Šibenik

03/2019. - Sudjelovanje na tečaju “Surgical techniques in the formation of cardiovascular anastomosis”, Osijek

05/2018. - Aktivni sudionik kongresa “The Annual Congress of the Croatian Society”, predavanje „Liječenje simptomatske aneurizme trbušne aorte EVAR-om u KBC-u Split“, Poreč

7/2017. - Završen tečaj “Ultrasound of blood vessels”, Beograd, Srbija

06/2017. - Aktivni sudionik „Godišnji kongres hrvatskog društva za Vaskularnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem“, predavanje „A. Lusoria“, Vodice

12/2016. - Sudjelovanje „6<sup>th</sup> Munich Vascular Conference“ s tečajem „Revision course on technical skills – preparation for the European examination as a FEBVS“, Njemačka

06/2016. - Sudjelovanje na kongresu „European Society for Cardiovascular and Endovascular Surgery“, Beograd, Srbija

05/2016. - Sudjelovanje „International Research Interdisciplinary School IRIS Catalonia Spain 2016“

01/2016. - Sudjelovanje na tečaju „Šivanje vaskularnih graftova“, Opatija

7/2015. - Sudjelovanje "3 rd IUA Course for Young Vascular Specialists", Češka

4/2015. - Sudjelovanje "VATS lobectomy course", Split

9/2014. - Završen tečaj iz osnove laparoskopske kirurgije, Zagreb

9/2014. - Sudjelovanje na tečaju "Anastomosis in cardiac and vascular surgery", Poljska

5/2014. - Sudjelovanje na radionicama "European Vascular Workshop" i "European Venous Master Class; Varicose veins treatment", Maastricht, Nizozemska

3/2014. - Sudjelovanje na tečaju "Procedures and the treatment of wounds", Zagreb

2/2014. - Sudjelovanje na tečaju "New sewing materials, grafts and local flaps", Zagreb

10/2013. - Sudjelovanje na tečaju "The central venous catheters for long-term use", Split

11/2011. doktorand doktorskog studija- „Klinička medicina utemeljena na dokazima“, Medicinski fakultet Split, Šoltanska 2, 21000 Split

10/2011. Završen tečaj "Advanced Life Support"

10/2004. - 07/2010. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
Šalata 2, 10000 Zagreb

2000. – 2004. Prva gimnazija Split,  
Nikole Tesle 10, 21000 Split

## **Publikacije**

1. „Immunoexpression Patterns of Megalin, Cubilin, Caveolin-1, Gipc1 and Dab2IP in the Embryonic and Postnatal Development of the Kidneys in Yotari (Dab1-/-) Mice“

Biomedicines

2. „Globus Pharyngeus: symptom of increased thyroid or laryngopharyngeal reflux“

Acta Clinica Croatica

3. „Endovascular Repair of Symptomatic (Non-ruptured) Abdominal Aortic Aneurysm in the University Hospital Centre Split

Journal of Pharmacy and Pharmacology

4. „The Effect of Extracellular Matrix Patch on Femoral Artery after Endarterectomy“

Journal of Vascular Surgery

5. „Guidelines for treatment of carotid artery stenosis“

Liječnički vjesnik

## **MATERINSKI JEZIK**

- hrvatski jezik

## **OSTALI JEZICI**

- engleski jezik (B2)

-talijanski jezik (B2)

- njemački jezik (A2)

## **OSTALE AKTIVNOSTI**

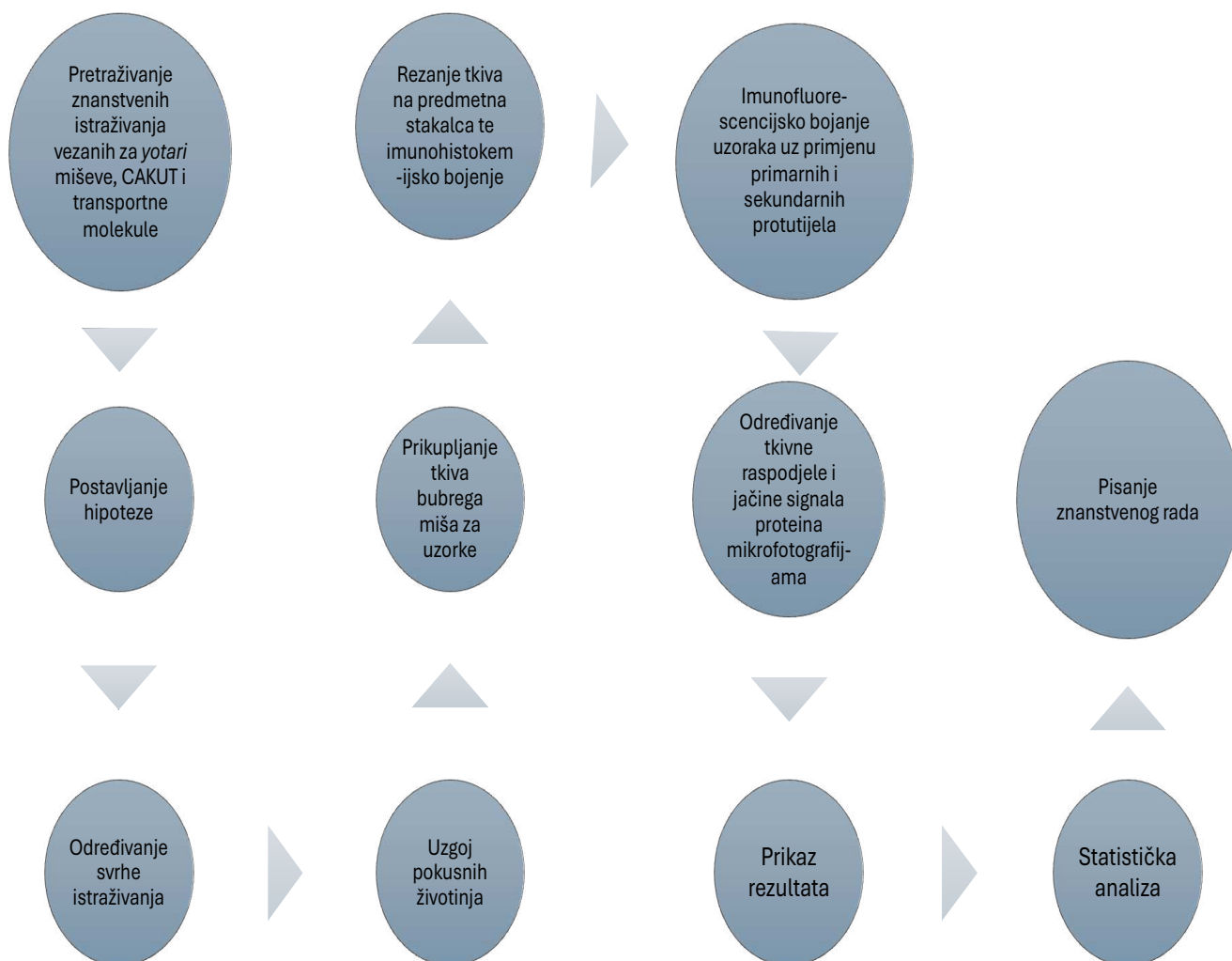
Digitalne vještine - Microsoft Office program

Vozačka dozvola - B

Hobi - putovanja, aerobik

## **11. DODATAK**

## Dijagram istraživanja



## Etička načela

Korištenje životinja u ovoj studiji odobreno je Smjernicama za njegu i korištenje laboratorijskih životinja Sveučilišta medicinske znanosti Shiga, Japan. Istraživanje je u skladu s načelima Helsinške deklaracije i dobilo je odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (klasa: 003-08/23-03/0015, šifra protokola broj: 2181-198-03-04-23-0073; datum odobrenja: 27. rujna 2023.).