

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Kristina M. Mitrović

Identifikacija mikro RNK u regionima genoma sa
retkim strukturnim varijantama kao potencijalnih
genetičkih uzročnika za nastanak urođenih
anomalija bubrega i urinarnog trakta čoveka

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Kristina M. Mitrović

Identification of micro RNAs in regions of the
genome with rare structural variants as potential
genetic drivers of congenital anomalies of the
kidney and urinary tract in humans

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Mentori:

dr Ivan Jovanović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Katarina Zeljić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Maja Živković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je plod rada i istraživanja sprovedenog u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Disertacija je realizovana u okviru PROMIS projekta „miFaDriCa“, ev. br. 6066923, koji je finansiran od strane Fonda za nauku Republike Srbije, pod neposrednim rukovodstvom dr Ivana Jovanovića i u okviru teme „Genetska osnova hronične inflamacije“, br. 451-03-47/2023-01/200017, finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a čiji je koordinator dr Aleksandra Stanković.

Prvenstveno, veliku zahvalnost dugujem mentoru, dr Ivanu Jovanoviću, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, na njegovom beskrajnom strpljenju i dragocenim savetima u svim fazama izrade ove doktorske disertacije, kao i na bodrenju tokom završnih faza pisanja doktorata.

Mentorki dr Katarini Zeljić, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na pregledu rada, sugestijama i podršci tokom pisanja ove doktorske disertacije, ali i tokom školovanja.

Dr Aleksandri Stanković, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, se zahvaljujem na ukazanoj prilici da budem deo tima Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku, kao i na podršci i dragocenim savetima tokom izrade ove disertacije. Zahvalna sam što je u našoj laboratoriji uspostavila temelj u istraživanju ovog kompleksnog oboljenja i na podsticanju da uvek težimo ka boljem.

Dr Maji Živković, naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, se zahvaljujem na pruženoj prilici i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ovog rada.

Dr Mariji Savić Veselinović, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na pregledu doktorske disertacije i konstruktivnim sugestijama koje su unapredile kvalitet teksta.

Svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku se zahvaljujem na kolegijalnosti i pomoći, a posebno dr Ivani Kolić na neizmernoj i nesebičnoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Jeleni Žakuli, na prenetom znanju i velikoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se kolegama sa Univerzitetske Dečje Klinike „Tiršova“, a posebno prof. dr Mirjani Kostić i prof. dr Zoranu Krstiću, na dugogodišnjoj saradnji u istraživanju genetičke osnove CAKUT-a.

Posebno se zahvaljujem Nikoli Kokanovu, Nataši Mačak, Milanu Stefanoviću, Milici Janković i dr Harisi Ferizović na pomoći, razumevanju i pozitivnoj energiji u trenucima kada je bilo najteže. Hvala na divnim trenucima druženja u našim pauzama u 11 sati, kao i na tome što smo postali zaista dobri prijatelji tokom ovih godina.

Bezgraničnu zahvalnost dugujem i svojim roditeljima, sestri i bratu, na ljubavi i podršci tokom čitavog mog školovanja.

I iznad svega, zahvaljujem se svom Marku, na безусловnoj ljubavi i strpljenju. Bio si nezamenljiv oslonac i podrška u svim trenucima!

Identifikacija mikro RNK u regionima genoma sa retkim strukturnim varijantama kao potencijalnih genetičkih uzročnika za nastanak urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta čoveka

Sažetak

Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta (engl. *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract* – CAKUT) su najčešći uzročnik terminalne bubrežne insuficijencije kod dece koja vodi hemodijalizi i transplantaciji bubrega. Retki CNV regioni su među najčešćim genetičkim varijantama koje su povezane sa nastankom CAKUT-a. Međutim, uloga miRNK čiji su geni lokalizovani u ovim regionima nije ispitana u kontekstu genetičkih uzročnika nastanka CAKUT-a. Glavni cilj ove studije bio je identifikacija i funkcionalna interpretacija miRNK koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Bioinformatičkom analizom pokazano je da 80% pacijenata sa CAKUT-om ima u identifikovanim retkim CNV regionima bar jedan gen koji kodira miRNK. Analiza mreže miRNK, koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, pokazala je dominantnu regulaciju dve miRNK, hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p. Funkcionalna studija pokazala je značajnu promenu u ekspresiji ovih miRNK u HEK293 ćelijskim linijama sa homozigotnom ili heterozigotnom delecijom gena za pomenute miRNK u odnosu na WT ćelijske linije, kao i promenu u ekspresiji njihovih ciljnih gena. Restitucijom nivoa hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p u ćelijskim linijama sa uvedenom homozigotnom ili heterozigotnom delecijom gena za miRNK potvrđen je potencijal ublažavanja efekta retkog CNV regiona na ekspresiju ciljnih gena miRNK koje su lokalizovane u ovim regionima. Ovo istraživanje ukazuje da bi izmenjena ekspresija ciljnih gena usled delecije gena za miRNK izazvane retkim CNV regionima mogla predstavljati jedan od mehanizama nastanka i fenotipske varijabilnosti CAKUT-a.

Ključne reči:

CAKUT, Bioinformatika, Mikro RNK, CNV regioni, miRNK mimike, Ekspresija gena.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

Identification of micro RNAs in regions of the genome with rare structural variants as potential genetic drivers of congenital anomalies of the kidney and urinary tract in humans

Abstract

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) are the most common cause of end-stage renal disease in children, which leads to hemodialysis and kidney transplantation. Rare CNV regions are among the most common genetic variants underlying CAKUT. However, the role of miRNAs located in these regions has not been investigated in the context of genetic drivers of CAKUT. The main aim of this study was the identification and functional interpretation of miRNAs located in CNV regions associated with CAKUT. Bioinformatic analysis showed that 80% of CAKUT patients have at least one miRNA gene in the identified rare CNV regions. Network analysis of miRNAs, which are most often located in rare CNV regions associated with CAKUT, showed a dominant regulation of two miRNAs, hsa-miR-484 and hsa-miR-185-5p. A functional study showed a significant change in the expression of these miRNAs in HEK293 cell lines with homozygous or heterozygous gene deletion for the mentioned miRNAs compared to WT cell lines, as well as a change in the expression of their target genes. Restitution of hsa-miR-484 and hsa-miR-185-5p levels in cell lines with introduced homozygous or heterozygous deletion of miRNA genes confirmed the potential to alleviate the effect of rare CNV regions on the expression of miRNA target genes located in these regions. This study indicates that altered expression of miRNA target genes due to deletion of miRNA genes caused by rare CNV regions could represent one of the mechanisms of the occurrence and phenotypic variability of CAKUT.

Key words:

CAKUT, Bioinformatics, Micro RNA, CNV regions, miRNA mimics, Gene expression.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

Skraćenice

3'UTR – (engl. *3' Untranslated Region*) 3' netranslatirajući region iRNK

5'UTR – (engl. *5' Untranslated Region*) 5' netranslatirajući region iRNK

AB – Anomalije bubrega

AGO – (engl. *Argonaute*) Argonaut proteini

APAF1 – (engl. *Apoptosis protease-activating factor-1*) Faktor koji aktivira proteazu apoptoze 1

ATF6 – (engl. *Activating transcription factor 6*) Aktivirajući transkripcioni faktor 6

BF-2 – (engl. *Brain factor 2*) Moždani faktor

BMP7 – (engl. *Bone morphogenetic protein 7*) Koštani morfogenetički protein-7

CAKUT – (engl. *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract*) Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta

Cas9 – (engl. *CRISPR-associated protein 9*) CRISPR asociran protein 9

CDC42 – (engl. *Cell division cycle 42*) Transkripcioni regulator ćelijskog ciklusa 42

cDNK – (engl. *Complementary DNA*) Komplementarna DNK

ceRNA – (engl. *competing endogenous RNA*) Kompetirajuće endogene RNK

CNV – (engl. *Copy Number Variation*) Varijacije u broju kopija

CRISPR – (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) Grupisani kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima

dbVar – (engl. *database of human genomic structural variation*) Baza podataka strukturnih varijanti humanog genoma

DECIPHER – (engl. *DatabasE of genomIc variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) Baza podataka o varijantama genoma i fenotipa kod čoveka koja koristi Ensembl podatke

DGCR8 – (engl. *DiGeorge syndrome Chromosomal [or Critical] Region 8*) Di Džordž sindrom kritični region 8 subjedinica mikroprocesorskog kompleksa

DGV – (engl. *Database of Genomic Variants*) Baza podataka varijanti genoma

DMEM – (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) DMEM medijum

DNaza I – Deoksiribonukleaza I

DSS – Duplirani sabirni sistem

EGF – (engl. *epidermal growth factor*) Epidermalni faktor rasta

ER – Endoplazmatični retikulum

EYA1 – (engl. *EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 1*) EYA transkripcioni koaktivator i fosfataza 1

FBS – (eng. *Fetal Bovine Serum*) Fetalni goveđi serum

FC – (engl. *Fold Change*) pokazuje koliko je puta nivo miRNK ili iRNK viši/niši u ciljnoj grupi u poređenju sa referentnom grupom uzoraka.

FGF – (engl. *Fibroblast growth factor*) Faktor rasta fibroblasta

FGF2 – (engl. *Fibroblast growth factor 2*) Faktor rasta fibroblasta 2

FIS1 – (engl. *Mitochondrial Fission 1 Protein*) Protein fisije mitohondrija 1

FoSTeS – (engl. *fork stalling and template switching*) Mehanizam FoSTeS

FRAS1 – (engl. *Fraser Extracellular Matrix Complex Subunit 1*) Frejzerova subjedinica 1 kompleksa ekstraćelijskog matriksa

GAPDH – (engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza

GATA3 – (engl. *Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*) Transkripcioni regulator specifičan za T ćelije

GDF11 – (engl. *Growth differentiation factor 11*) Faktor diferencijacije rasta 11

GDNF – (engl. *Glial cell line-derived neurotrophic factor*) Neurotropni faktor poreklom od glijalnih ćelija

GFR α 1 – (engl. *GDNF family receptor alpha-1*) GDNF familija receptora alfa-1

GUDMAP – (engl. *GenitoUrinary Development Molecular Anatomy Project*) Projekat razvojne molekularne anatomije genitourinarnog trakta

HEK293 – (engl. *Human Embryonic Kidney 293*) Ćelijska linija humanog embrionalnog bubrega

HOX11 – (engl. *T-cell leukemia homeobox protein 1*) Homeobox protein 1

KEGG – (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Kjoto enciklopedija gena i genoma

lncRNA – (engl. *long non-coding RNA*) Duge nekodirajuće RNK

MBP7 – (engl. *Myelin basic protein 7*) Mijelin osnovni protein 7

MDM2 – (engl. *Mouse double minute 2 homolog*) *Double minute 2* homolog miša

miRBase – (engl. *Database of published miRNA sequences and annotation*) Baza objavljenih sekvenci i anotacija miRNK

miRNK – Mikro RNK

MMEJ – (engl. *microhomology-mediated end-joining*) Spajanje krajeva zasnovano na maloj homologiji

MREs – (engl. *miRNA response elements*) miRNK vezivna mesta

N/A – (engl. *not applicable*) Nije primenljivo

NGS – (engl. *Next-Generation Sequencing*) Sekvenciranje nove generacije

NHEJ – (engl. *nonhomologous end-joining*) Nehomologo spajanje krajeva

NOTCH – (engl. *Neurogenic locus notch homolog*) Neurogeni notch homolog

NOTCH3 – (engl. *Neurogenic locus notch homolog 3*) Neurogeni notch homolog 3

NPNT – (engl. *Nephronectin*) Nefronektin

Ns – (engl. *Nonsignificant*) Nije značajno

OSR1 – (engl. *Protein odd-skipped-related 1*) Protein *odd-skipped-related 1*

OU – Opstruktivne uropatije

p53 – (engl. *Tumor Protein p53*) Tumor protein P53

PABPC – (engl. *poly(A)-binding protein*) Protein koji se u citoplazmi veuje za poli(A) rep

PAX2 – (engl. *Paired box 2*) *Paired Box* transkripcioni regulator 2

PAX8 – (engl. *Paired box 8*) *Paired Box* transkripcioni regulator 8

PDGF-B – (engl. *Platelet-derived growth factor subunit B*) Subjedinica B faktora rasta koji potiče od trombocita

PDGF-R – (engl. *Platelet-derived growth factor receptor*) Receptor faktora rasta koji potiče od trombocita

PKD1 – (engl. *Polycystin-1*) Policistin-1

Pre-miRNK – Prekursor miRNK

Pri-miRNK – Primarni miRNK transkript

qRT-PCR – Reverzna transkripcija i kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

RAR α – (engl. *Retinoic acid receptor alpha*) Receptor retinoične kiseline alfa

RAR β 2 – (engl. *Retinoic acid receptor beta*) Receptor retinoične kiseline beta

RET – (engl. *RET Receptor Tyrosine Kinase*) Receptor tirozin kinaza za neurotropni faktor poreklom od glijalnih ćelija

RHOA – (engl. *Ras homolog family member A*) Član familije Ras proteina A

RISC – (engl. *miRNA induced silencing complex*) Kompleks za utišavanje ekspresije gena indukovano molekulom miRNK

SALL1 – (engl. *Spalt-Like Transcription Factor 1*) *Spalt*-sličan transkripcioni regulator 1

sgRNA – (engl. *single guide RNA*) Vodeća RNK

SIX2 – (engl. *Sine Oculis Homeobox Homolog 2*) *Sine Oculis* homolog 2

UUO – (engl. *Unilateral ureteral obstruction*) Unilateralna opstrukcija uretera

VEGF – (engl. *Vascular endothelial growth factor A*) Vaskularni endotelni faktor rasta A

VUR – Vezikoureteralni refluks

VZU – Valvula zadnje uretre

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Molekularna osnova razvića bubrega i urinarnog sistema	1
1.2. Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta	2
1.2.1. Kliničke karakteristike CAKUT-a	3
1.3. Genetička osnova nastanka CAKUT-a	5
1.4. Varijacije u broju kopija	5
1.4.1. Mehanizmi nastanka varijacija u broju kopija	7
1.5. CNV regioni koji su asocirani sa CAKUT-om	8
1.6. Biogeneza i funkcija miRNK	8
1.7. Manipulacija nivoa miRNK korišćenjem miRNK mimika	11
1.8. Mikro RNK u CAKUT-u	11
2. Ciljevi rada	13
3. Materijal i metode	14
3.1. Prikupljanje podataka o retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	15
3.2. Opterećenje gena koji kodiraju miRNK retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	15
3.3. Mapiranje i identifikacija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	16
3.4. Bioinformatička analiza miRNK i miRNK familija koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	18
3.5. Ćelijske linije	18
3.6. Ćelijska kultura	19
3.7. Sekvenciranje nove generacije	20
3.8. Selekcija miRNK kandidata i njihovih ciljnih gena	21
3.9. Tranzijentna transfekcija ćelija	22
3.10. Ekstrakcija ukupne RNK iz kultivisanih ćelija	23
3.11. Reverzna transkripcija	24
3.12. Relativna kvantifikacija ekspresije miRNK i iRNK ciljnih gena	25
3.13. Analiza relativnih nivoa miRNK i iRNK	26
4. Rezultati	27
4.1. Procena opterećenja gena koji kodiraju miRNK, retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	27
4.2. Identifikacija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	29
4.3. Bioinformatička analiza miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	32
4.4. Analiza miRNoma primenom metode sekvenciranja nove generacije	36

4.5. Kvantifikacija ekspresije miRNK kandidata i iRNK ciljnih gena	38
4.5.1. Relativna kvantifikacija ekspresije hsa-miR-484, hsa-miR-185-5p i iRNK ciljnih gena u nokaut ćelijskim linijama i HEK293 WT	38
4.5.2. Relativna kvantifikacija ekspresije hsa-miR-484, hsa-miR-185-5p i iRNK ciljnih gena nakon tretmana ćelijskih linija odgovarajućim miRNK mimikama	43
5. Diskusija.....	53
5.1. Opterećenje gena koji kodiraju miRNK CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om ..	53
5.2. Identifikacija i bioinformatička interpretacija miRNK i miRNK familija koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om	54
5.3. Analiza miRNoma HEK293 WT, HEK293 MIR484 KO ^{het} i HEK293 MIR185 KO ^{hom} ćelijskih linija	56
5.4. CNV regioni utiču na promenu u ekspresiji miRNK kandidata <i>in vitro</i> i posledično na promenu u ekspresiji njihovih ciljnih gena	56
5.5. Efekat restitucije nivoa hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p na ekspresiju ciljnih gena.....	61
6. Zaključci	65
7. Literatura.....	66

BIOGRAFIJA AUTORA

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Izjava o korišćenju

1. Uvod

Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta (engl. *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract* – CAKUT) obuhvataju spektar strukturnih i funkcionalnih poremećaja urinarnog sistema, koji nastaju tokom intrauterinog fetalnog razvoja (Toka i sar., 2010; Renkema i sar., 2011; Rodriguez, 2014). CAKUT je najčešći uzročnik terminalne bubrežne insuficijencije, koja vodi hemodijalizi i transplantaciji u ranom životnom dobu (Ramayani i sar., 2018). Ipak, iako su posledice značajne, molekularna osnova nastanka CAKUT-a je i dalje nedovoljno istražena. To otežava postavljanje dijagnoze i pružanje odgovarajuće terapije. Proučavanje molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka CAKUT-a, ne samo da je od suštinskog značaja za razumevanje same patogeneze, već i za identifikaciju novih molekularnih targeta koji bi mogli biti ključni za buduće metode predikcije i prevencije nastanka CAKUT-a.

Glavni fokus istraživanja u okviru ove disertacije je bio usmeren na identifikaciju i funkcionalnu interpretaciju mikro RNK (miRNK) na koje utiču retki CNV regioni (engl. *Copy number variation*) koji su asocirani sa CAKUT-om. Da bi se utvrdio efekat delecije gena koji kodira miRNK na ekspresiju ciljnih gena, rađena je funkcionalna studija u kojoj su dizajnirani model sistemi, ćelijske linije sa heterozigotnom i homozigotnom delecijom selektovanih gena za miRNK, nakon čega je rađena i restitucija nivoa miRNK u pomenutim modelima za funkcionalnu potvrdu njihovog efekta na ciljne gene kandidate. Budući da je sve više kliničkih studija koje istražuju terapijski efekat restitucije nivoa miRNK sa izmenjenom ekspresijom u različitim bolestima, identifikacija i karakterizacija funkcionalnog efekta broja kopija gena koje kodiraju miRNK na razvoj CAKUT-a, mogli bi ukazati na nove miRNK kao potencijalne terapeutike.

1.1. Molekularna osnova razvića bubrega i urinarnog sistema

Embrionalno razviće bubrega i urinarnog trakta je precizno kontrolisan proces od strane prostorno i vremenski regulisanih kompleksnih mehanizama molekularnih interakcija. Komunikacija između metanefričkog mezenhima i ureterovog pupoljka je ključan proces za razvoj bubrega. Tokom razvića, kada ureterov pupoljak dođe u kontakt sa metanefričnim mezenhimom, prolazi kroz kaskadu grananja koja će formirati složenu mrežu tubula koji će kasnije postati sabirni kanali, bubrežne čašice, bubrežna karlica, i ureteri. GDNF (engl. *Glial cell line-derived neurotrophic factor*) – RET (engl. *RET Receptor Tyrosine Kinase*) signalni put ima centralnu ulogu u pupljenju uretera, a regulisan je od strane mnogobrojnih faktora koji uključuju GFR α 1 (engl. *GDNF family receptor alpha-1*), EYA1 (engl. *EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 1*), HOX11 (engl. *T-cell leukemia homeobox protein 1*), SALL1 (engl. *Spalt-Like Transcription Factor 1*), SIX2 (engl. *Sine oculis homeobox homolog 2*), PAX2 (engl. *Paired box 2*), OSR1 (engl. *Protein odd-skipped-related 1*), GDF11 (engl. *Growth differentiation factor 11*), FRAS1 (engl. *Fraser extracellular matrix complex subunit 1*), NPNT (engl. *Nephronectin*), GATA3 (engl. *Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*), β -katenin (Moore i sar., 1996; Schuchardt i sar., 1994; Cacalano i sar., 1998; Abdelhak i sar., 1997; Wellik i sar., 2002; Nishinakamura i sar., 2001; Xu i sar., 2003; Brophy i sar., 2001; Esquela i Lee, 2003; James i sar., 2006; Pitera i sar., 2008; Grote i sar., 2008; Marose i sar., 2008). Istovremeno, recipročne interakcije između metanefričkog mezenhima i ureterovog pupoljka igraju ključnu ulogu u indukovanju nefrogeneze, pri čemu određene mezenhimske ćelije prolaze kroz tranziciju epitela u mezenhim i formiraju bubrežne vezikule u blizini vrhova novoformiranih grana uretera, od kojih će se formirati nefroni, funkcionalne jedinice bubrega (Blake i Rosenblum, 2014). WNT proteini, posebno WNT9b i WNT4 u okviru WNT signalnog puta imaju kritičnu ulogu u ovom procesu (Stark i sar., 1994). Tubulogeneza i vaskularizacija nastalog glomerula regulisane su faktorima poput VEGF (engl.

Vascular endothelial growth factor), BF-2 (engl. *Brain factor 2*), BMP7 (engl. *Bone morphogenetic protein 7*), PDGF-B (engl. *Platelet-derived growth factor subunit B*), PDGF-R (engl. *Platelet-derived growth factor receptor*), FGF2 (engl. *Fibroblast growth factor 2*), PAX8 (engl. *Paired box 8*), NOTCH (engl. *Neurogenic locus notch homolog*) (Eremina i sar. 2003; Hatini i sar., 1996; Alpers i sar., 1992; Perantoni i sar., 1995). Međutim, ne prolaze sve mezenhimske ćelije kroz tranziciju epitela u mezenhim, već ostaju kao ćelije strome između tubula u razvoju. Neki faktori kao što su MBP7 (engl. *Myelin Basic Protein 7*) i FGF (engl. *Fibroblast growth factor*) inhibiraju apoptozu neindukovanog metanefričnog mezenhima i posleđično utiču na povećanje broja ćelija strome. Ove ćelije takođe stimulišu morfogenezu grananja uretera kroz ekspimiranje receptora retinoične kiseline RAR α (engl. *Retinoic acid receptor alpha*) i RAR β 2 (engl. *Retinoic acid receptor beta*). Kroz precizno regulisanje ekspresije svih ovih gena i molekularne interakcije njihovih produkata - proteina obezbeđuje se formiranje funkcionalnih bubrega i urinarnog trakta, a promena u ovim procesima može dovesti do razvoja CAKUT-a (Vivante i sar., 2014; Schedl, 2007), što naglašava važnost razumevanja genetičke osnove molekularnih mehanizama koji su u osnovi razvića bubrega i urinarnog trakta.

U cilju boljeg razumevanja molekularne osnove razvića bubrega i urinarnog trakta započet je GUDMAP projekat (engl. *GenitoUrinary Development Molecular Anatomy Project*) (<https://www.atlas-d2k.org/gudmap/>) koji kroz konzorcijum laboratorija radi na generisanju podataka ekspresije gena tokom razvića bubrega i urogenitalnog sistema miša i čoveka. To će biti osnova za pravljenje repozitorijuma podataka velikog obima i razvoj novih alata za istraživanje CAKUT-a i implementaciju GUDMAP4 faze u periodu od 2021. do 2026. godine što će omogućiti sveobuhvatno razumevanje gena uključenih u razvoj, starenje i regeneraciju organa. Iako je dosta gena koji su uključeni u kontrolu embrionalnog razvića bubrega i urinarnog trakta već identifikovano, istraživanje njihovih međusobnih interakcija i načina regulacije u nastanku CAKUT-a je i dalje aktuelno jer se još uvek ne zna koji su geni, odnosno genetički regulatori glavni pokretači razvojnih anomalija (Blake i Rosenblum, 2014; Dressler, 2006). Takođe, CAKUT je jedna od bolesti koja je odabrana kao studija slučaja za Evropski program za retke bolesti (engl. *European Joint Programme on Rare Diseases – EJP RD*) (<https://www.ejprarediseases.org/what-is-ejprd/project-structure/>). Ovaj program se fokusira na integraciju istraživanja koja su sprovedena u više od 130 institucija iz 30 zemalja. EJP RD projekat razvija bioinformatičke strategije za sveobuhvatnu analizu i integraciju prethodno objavljenih podataka o miRNomu, proteomu i peptidomu dobijenih iz amnijskih tečnosti trudnoća koje uključuju fetuse sa teškim i blažim oblikom CAKUT-a.

1.2. Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta

Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta pogađaju oko 1 od 500 dece (Lanzoni i sar., 2017), što ih čini najčešćim urođenim anomalijama. Odgovorne su za 34–59% slučajeva terminalne bubrežne insuficijencije kod dece (Ramayani i sar., 2018) i u osnovi su 41,3% svih transplantacija bubrega kod dece (Chesnaye i sar., 2014). CAKUT se obično dijagnostikuje ultrazvukom prenatalno ili kasnije u životu zbog komplikacija koje se javljaju. Pacijenti sa CAKUT-om često imaju učestale infekcije urinarnog trakta. Medicinska nega ovih pacijenata može biti složena i zahteva multidisciplinarni pristup koji je prilagođen pacijentu. Terapijske opcije su ograničene na simptomatske tretmane koji se fokusiraju na očuvanje funkcije bubrega, prevenciju infekcija urinarnog trakta, poboljšanje kvaliteta života, ublažavanje simptoma terminalne bubrežne insuficijencije i ako je potrebno, obezbeđivanje terapije transplatacije bubrega. Zbog toga su eksperimentalna i klinička istraživanja neophodna kako bi se ovim pacijentima osiguralo pravovremeno praćenje bolesti, primena adekvatne terapije, procena rizika od kasnijih komplikacija

i na kraju postizanje klinički boljeg ishoda (Song i Yosypiv, 2011; Murugapoopathy i Gupta, 2020) i pronalaženje novih biomarkera (Stanković, 2021).

1.2.1. Kliničke karakteristike CAKUT-a

CAKUT je heterogeno oboljenje koje može obuhvatati različite strukturne i funkcionalne anomalije bubrega i uretera, kako jednostrano, tako i obostrano. Osim toga, može obuhvatati više pojedinačnih ili udruženih poremećaja na gornjim i donjim segmentima bubrežno-urinarnog sistema.

Najčešće korišćena klasifikacija CAKUT-a zasniva se na anatomskim karakteristikama (Slika U1). Bubrežne anomalije obuhvataju promene u broju, veličini, položaju ili obliku bubrega, koje se mogu primetiti na makroskopskom nivou. Mikroskopski, ove anomalije se prepoznaju kroz smanjen broj nefrona ili prisustvo abnormalne histologije. Promene u broju bubrega uključuju prisustvo više bubrega ili potpuno odsustvo bubrega (ageneza). Jednostrana ageneza bubrega je često asimptomatska, ali oko 50-70% pacijenata može imati prisustvo drugih urogenitalnih anomalija kao što je displazija, ektopija, refluks i proteinurija. Sa druge strane, obostrana ageneza (poznata kao Potterov sindrom) je nekompatibilna sa životom. Veličina bubrega je prvenstveno određena ukupnim brojem nefrona koji se formiraju tokom razvoja. Hipoplazija bubrega označava smanjenje mase parenhima bubrega usled nedovoljnog broja nefrona, koji su inače intaktni, dok displastični bubreg karakterišu strukture koje se nisu razvile na normalan način, poput nezrelih nefrona, nediferencirane strome i nekompletnog grananja. Displastični bubrezi mogu biti manji, normalne veličine ili blago uvećani u poređenju sa zdravim bubrežima. Multicistični displastični bubreg je jedan oblik bubrežne displazije, koga karakterišu prisustvo cista različitih veličina i odsustvo normalnog razvića pijelokaliksnog sistema. Defekti položaja bubrega nastaju kada su bubrezi pomereni duž prednje-zadnje osovine u abdomenu ili mediolateralno u odnosu na njihovu normalnu lokaciju u odnosu na sredinu tela. Svaka promena položaja bubrega može rezultovati fuzijom bubrega. Potkovičasti bubreg je stanje u kome bubrezi nemaju normalan pasuljast oblik, već je došlo do delimične fuzije bubrega, gde su oni međusobno spojeni na donjim polovima i formiraju strukturu u obliku potkovice. Bubrežni parenhim može biti histološki normalan ukoliko nije oštećen usled prisustva refluksa ili opstrukcije. U slučaju potpune fuzije, javlja se bubreg u obliku palačinke, koji je smešten u sredini karlice. Migracija bubrega tokom razvića se odvija istovremeno sa rotacijom bubrega kada svaki bubreg rotira za 90° ka unutra. Ektopični bubrezi nastaju prekidom migracije bubrega ka bubrežnoj loži. Bubreg se može zaustaviti u položaju koji je niži (karlično) ili viši (torakalno) u odnosu na normalan položaj, a ektopija može biti jednostavna ili ukrštena kada se bubreg nalazi na suprotnoj strani od mesta ulaska uretera u bešiku. Malrotirani bubrezi su abnormalno rotirani duž njihove duže ose. Bubrežni parenhim je jedini deo urinarnog sistema koji proizvodi urin, a najčešće stanje koje pogađa ovaj deo su ciste (Jain i Chen, 2019; Stonebrook i sar., 2019).

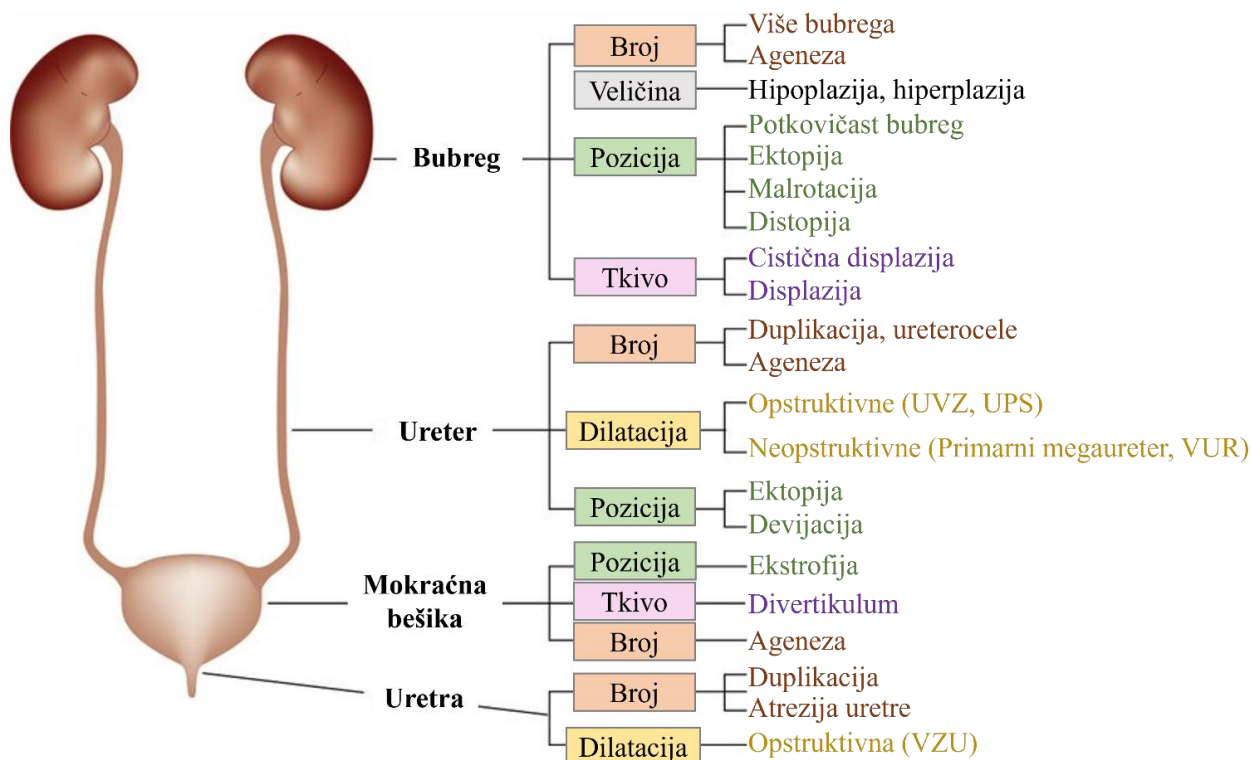
Anomalije urinarnog trakta obuhvataju opstruktivne i refluksne anomalije, koje mogu biti anatomske ili funkcionalne. Opstruktivne anomalije karakteriše suženje koje otežava, usporava ili potpuno prekida protok urina, dok refluksne anomalije podrazumevaju retrogradni tok urina u manjem ili većem obimu u poređenju sa fiziološkim protokom. Vrste opstruktivnih anomalija uključuju opstrukciju ureteropelvičnog spoja (UPS), opstrukciju ureterovezikalnog spoja (UVZ) i megaurter. Za razliku od opstruktivnih anomalija koje uzrokuju poteškoće u protoku urina, refluksne anomalije karakteriše retrogradni tok urina iz mokraćne bešike u ureter, a zatim dalje kroz pijelokaliksni sistem i bubrežnu karlicu, pri čemu može da dovede do oštećenja parenhima svojim retrogradnim pritiskom. Kod primarnog veziko-ureteralnog refluksa (PVUR), valvula između između uretera i mokraćne bešike se ne zatvara pravilno, zbog čega dolazi do vraćanja urina kroz ureter prema bubrežima. Sa druge strane, sekundarni VUR je prouzrokovan defektima donjeg urinarnog trakta, kao

što su valvula zadnje uretre ili ureterocela. Mnoga deca, posebno ona sa VUR-om niskog stepena, prerastaju ovu anomaliju tokom rasta, što je verovatno posledica produženja submukoznog segmenta uretera. Međutim, ove anomalije povećavaju rizik od infekcija urinarnog trakta, a neuspeh da se ispravi anomalija može dovesti do oštećenja bubrega ili čak do potpunog gubitka funkcije bubrega. Hidronefroza je stanje u kojem dolazi do dilatacije bubrežne karlice i čašica, obično uzrokovane prekidom normalnog toka urina. Tako, hidronefroza predstavlja posledicu direktnih i indirektnih efekata stanja koja utiču na tok urina i nije sama po sebi poseban entitet bolesti. Pored ovih funkcionalnih anomalija sprovodnog sistema, postoje i anatomske: dupliranje, ageneza i ektopija uretera (Rodriguez, 2014; Jain i Chen, 2019; Stonebrook i sar., 2019).

Defekti donjeg urinarnog trakta (mokraćne bešike i uretre) obuhvataju agenezu i ekstrofiju mokraćne bešike, valvulu zadnje uretre (VZU) ili agenezu uretre. VZU je opstrukcija prednjeg dela uretre koji je najbliži izlazu iz mokraćne bešike (Jain i Chen, 2019; Stonebrook i sar., 2019).

Varijabilnost ispoljavanja CAKUT-a predstavlja veliki izazov u pedijatrijskoj medicini, budući da može uzrokovati širok spektar simptoma i komplikacija. Ove anomalije su često povezane sa češćim bubrežnim infekcijama i oštećenjem bubrežne funkcije, što može dovesti do hemodijalize ili transplantacije bubrega kod dece.

Međuzavisnost različitih razvojnih puteva objašnjava zašto defekti u različitim genima mogu dovesti do sličnih fenotipova (Blake i Rosenblum, 2014). Takođe, to ilustruje i razlog zbog kog mutacija u jednom genu može imati plejotropne efekte, čime se naglašava da sama morfološka klasifikacija ne može precizno predvideti primarnu promenu u genomu (Sanna-Cherchi i sar., 2007).



Slika U1. Fenotipski spektar urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta. Preuzeto i adaptirano iz Khan i sar., 2022.

1.3. Genetička osnova nastanka CAKUT-a

Iako se CAKUT najčešće javlja sporadično, može biti prisutan i u porodicama. Pacijenti sa CAKUT-om često imaju članove porodice koji takođe imaju neku od anomalija urinarnog sistema, iako možda bez ikakvih simptoma. Takođe fenotipska varijabilnost među članovima porodice sa istom promenom u genomu, varira u rasponu od asimptomatskih strukturnih abnormalnosti do uznepredovale bubrežne insuficijencije (Schwaderer i sar., 2007; Kerecuk i sar., 2007). Porodični oblik CAKUT-a prisutan je u 10-20% slučajeva, pri čemu se nasleđuju na autozomno dominantan ili ređe, autozomno recesivan način (Sanna-Cherchi i sar., 2005; Sanna-Cherchi i sar., 2007). Takođe, CAKUT se može javiti u sindromskom i nesindromskom obliku. Nesindromski, izolovani CAKUT se javlja kao pojedinačna malformacija, ograničena na bubrege i urinarni trakt dok se u sindromskom obliku bubrežni defekti javljaju u kombinaciji sa defektima drugih organa (Sanna-Cherchi i sar., 2007). Kada je prisutno više od jedne anomalije, mogu biti nezavisne ili je uloga jedne od njih centralna u nastanku fenotipa (Pope i sar., 1999; Hiraoka i sar., 2002).

Autozomno dominantna mutacija u genu *PAX2* može dovesti do sindromskog CAKUT-a (Sanyanusin i sar., 1995). *PAX2* učestvuje u pravilnom razvoju oka, bubrega i centralnog nervnog sistema (Sanyanusin i sar., 1995). Kada nedostaje jedan funkcionalni alel usled delecije koja menja okvir čitanja, dolazi do razvoja hipoplastičnih bubrega, koji se odlikuju smanjenim brojem nefrona. Međutim, potpuni nedostatak funkcionalnog proteina, dovodi do mortaliteta zbog odsustva funkcionalnih bubrega (Nishimoto i sar., 2001). Za više od 50 gena je pokazano da učestvuju u patogenezi izolovanog i sindromskog CAKUT-a (Sanyanusin i sar., 1995; Abdelhak i sar., 1997; Nishimura i sar., 1999; Lindner i sar., 1999; Sanna-Cherchi i sar., 2018), od kojih su najčešće patogene promene u *HNF1B* i *PAX2*, koje objašnjavaju oko 5%-15% slučajeva pacijenata sa CAKUT-om (Weber i sar., 2006; Heidet i sar., 2010; Thomas i sar., 2011; Madariaga i sar., 2013; Ahn i sar., 2020). Međutim, iako broj identifikovanih gena koji su asocirani sa CAKUT-om raste, pokazalo se da je njihov doprinos riziku za razvoj CAKUT-a mnogo manji od očekivanog (Nicolaou i sar., 2016) i da su promene u ovim genima identifikovane kod svega 6-20% pacijenata sa CAKUT-om (Nicolaou i sar., 2015).

Genetičke varijante u genima koji su povezani sa razvićem bubrega i urinarnog trakta i/ili sa gubitkom bubrežne funkcije usled inflamacije i/ili infekcije često su asocirani sa nastankom CAKUT-a i težinom bolesti (Kostić i sar., 2004; Stanković i sar., 2010; Spasojević-Dimitrijeva i sar., 2010; Djuric i sar., 2014).

Pored promena u jednom genu i varijanti gena, retke strukturne varijante su među najčešćim genetičkim varijantama koje su asocirane sa nastankom ovih anomalija (Capone i sar., 2017).

1.4. Varijacije u broju kopija

Varijacije u broju kopija predstavljaju segmente DNK koji se ponavljaju u genomu u različitom broju kopija u poređenju sa referentnim genomom (Nakatochi i sar., 2021). Razlikuju se po veličini, u rasponu od ≥ 50 baznih parova (Alkan i sar., 2011) do nekoliko megabaza (Mbp) i mogu da obuhvataju veći broj gena (Thapar i Cooper, 2013). CNV regioni mogu biti česti, kada je njihova učestalost u opštoj populaciji $\geq 1\%$ i retki kada je njihova učestalost u opštoj populaciji $< 1\%$ (Nakatochi i sar., 2021).

Varijacije u broju kopija se mogu klasifikovati u dva tipa: nebalansirane varijante, poput delecija, duplikacija i insercija i balansirane varijante kao što su inverzije i translokacije (Feuk i sar., 2006) (Slika U2). Balansirane varijante na utiču na broj kopija određenog DNK segmenta u

poređenju sa referentnim genomom, dok nebalansirane varijante menjaju broj kopija određenog DNK segmenta u poređenju sa referentnom genomu.

Iako varijacije u broju kopija mogu biti neutralne ili čak predstavljati prednost za svog nosioca (Zhang i sar., 2009), neke od njih mogu biti štetne jer su određeni geni posebno osetljivi na promene u broju kopija. Duplikacije ili delecije ovih gena mogu dovesti do bolesti koje se u ovom slučaju označavaju kao genomski poremećaji (Lupski, 1998).

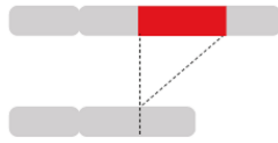
CNV regioni su često prisutni u genomima zdravih osoba bez očigledne povezanosti sa bolestima (Sebat i sar., 2004; Redon i sar., 2006; McCarroll i sar., 2006). Oni objašnjavaju veću međuindividualnu varijabilnost između genoma u smislu ukupnog broja uključenih baza nego sve varijante na nivou jednog nukleotida i male insercije-delecije (indel), zajedno (Sudmant i sar., 2015; Lupski i sar., 2015). Međutim, iako postoje CNV regioni koji su benigni u čovekovom genomu, mnogi su ipak povezani sa etiologijom različitih bolesti (Stankiewicz i Lupski, 2010; Girirajan i sar., 2011). Zbog toga se CNV regioni sve više prepoznaju kao značajan izvor ne samo genetičke raznovrsnosti u opštoj populaciji, već i kao uzročni faktori u mnogim bolestima.

Promena u broju kopija jednog ili više gena, uzrokovana velikom delecijom ili duplikacijom, najčešći je mehanizam patogeneze bolesti posredovane CNV regionima. Drugi mehanizmi uključuju inaktivaciju gena putem intragenskih CNV regiona, što dovodi do haploinsuficijencije (Boone i sar., 2010; Wiszniewska i sar., 2014). CNV regioni takođe mogu da izmene ekspresiju gena koji su uzvodno ili nizvodno od CNV regiona, tako što ometaju regulatorne elemente kao što su pojačivači ili promotori (Zhang i Lupski, 2015; Chiang i sar., 2017). Još jedan važan aspekt je da CNV može biti značajan pokazatelj na osnovu kog se mogu otkriti recesivni poremećaji, kada delecija jednog alela gena uzrokuje ispoljavanje tačkaste mutacije na drugom alelu, što dovodi do bolesti.

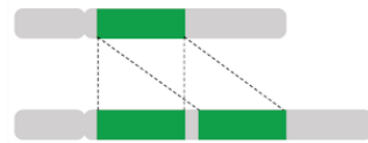
Sistematizacijom CNV regiona generisane su javne baze podataka, kao što su dbVar (engl. *database of human genomic structural variation*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/>), DGV (engl. *Database of Genomic Variants*) (<https://www.ebi.ac.uk/dgva/>), DECIPHER (engl. *DatabasE of genomiC varIation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*) (<https://www.deciphergenomics.org/>) i ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), koje obezbeđuju arhiviranje klinički značajnih CNV regiona ili onih koji su identifikovani kod zdravih kontrola.

Nebalansirani CNV regioni

A. Delecije



B. Duplikacije

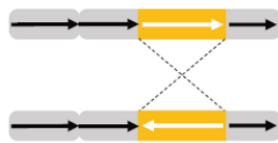


C. Insercije

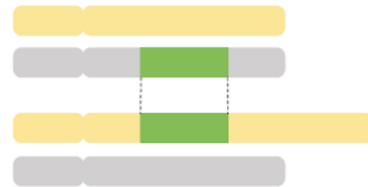


Balansirani CNV regioni

D. Inverzije



E. Translokacije



Slika U2. Tipovi varijacija u broju kopija. A) Delecije, B) Duplikacije, C) Insercije, D) Inverzije i E) Translokacije. Preuzeto i adaptirano iz Nakatochi i sar., 2021.

1.4.1. Mehanizmi nastanka varijacija u broju kopija

Nekoliko molekularnih mehanizama je uključeno u formiranje CNV regiona, uključujući i one vezane za rekombinaciju DNK, reparaciju i replikaciju (Hastings i sar., 2009; Carvalho i Lupski, 2016). CNV može nastati kao posledica nealelske homologe rekombinacije, kada dolazi do interhromozomskog i intrahromozomskog krosingovera. U slučaju nealelske homologe rekombinacije koja se dešava u okviru jedne hromatide jednog hromozoma, dolazi do delecije genetičkog materijala, a ako se dešava između dve sestrinske hromatide može doći do inverzije.

Još nekoliko molekularnih mehanizama je uključeno u formiranje CNV regiona, kao što su nehomologo spajanje krajeva (engl. *nonhomologous end-joining* – NHEJ), spajanje krajeva zasnovano na maloj homologiji (engl. *microhomology-mediated end-joining* – MMEJ), i mehanizam FoSTeS (engl. *fork stalling and template switching*). NHEJ je primarni put za popravku dvolančanih prekida DNK (Lieber, 2010). NHEJ ne zahteva visoku homologiju sekvence, za razliku od nealelske homologe rekombinacije. MMEJ je alternativni NHEJ mehanizam u kome se dvolančani prekidi popravljaju korišćenjem mikrohomologije sekvenci koja obično obuhvata 5–25 bazna para (McVey i Lee, 2008). FoSTeS je mehanizam koji se aktivira kada dođe do greške tokom procesa replikacije DNK. U ovom mehanizmu, kada dođe do zaustavljanja replikacione viljuške usled jednolančanog prekida, zaostajući lanac prelazi sa originalne na drugu replikacionu viljušku koja se nalazi u blizini. Ovo je praćeno nastavkom replikacije DNK, ali i formiranjem CNV-a (Lee i sar., 2007).

1.5. CNV regioni koji su asocirani sa CAKUT-om

Veliki broj retkih CNV regiona je asociran sa CAKUT-om, što ukazuje da su razvoj bubrega i urinarnog trakta čoveka posebno osetljivi na promenu broja kopija gena (Sanna-Cherchi i sar., 2012; Westland i sar., 2015; Siomou i sar., 2017; Verbitsky i sar., 2019; Ahn i sar., 2020). U velikoj studiji, koja je obuhvatala 522 pacijenta sa CAKUT-om i 13 000 kontrola, je prijavljeno da skoro 17% pacijenata sa CAKUT-om ima patogene CNV regione (Sanna Cherchi i sar., 2012).

Poznavanje genetičkih uzročnika nam omogućava da razumemo koji biološki put je uključen u razvoj bolesti kao i da postavimo tačnu dijagnozu. Međutim, često se dešava da iako identifikovani CNV ispunjava kriterijume da bude okarakterisan kao patogen ili uslovno patogen, genetički uzročnik koji dovodi do nastanka bolesti obično nije precizno definisan (Verbitsky i sar., 2019). U dosadašnjim studijama je glavni fokus bio na genima koji kodiraju proteine, dok su geni za nekodirajuće transkripte, obuhvaćeni retkim CNV regionima ostali nedovoljno istraženi. U okviru nekodirajućih transkripata, miRNK imaju najveći potencijal da regulišu ekspresiju većeg broja ciljnih gena. Promene u broju kopija ovih gena može rezultovati izmenjenim funkcionisanjem kompletnih signalnih puteva, čineći ih značajnim kandidatima za dalja istraživanja. To podržava potrebu za istraživanjem CNV regiona koji su asocirani sa pojavom CAKUT-a, pored gena koji kodiraju proteine, jer bi se u ovim regionima moglo sakriti mnoštvo moćnih molekularnih regulatora. Mikro RNK su jedan od tih potencijalnih regulatora koji imaju sposobnost da koordiniraju regulatorne mreže genoma (Martinez i Walhout, 2009; Lai i sar., 2016).

1.6. Biogeneza i funkcija miRNK

miRNK su kratke (18-25 nukleotida), evoluciono očuvane, endogeno eksprimirane RNK, koje pripadaju porodici nekodirajućih RNK molekula (Ha i Kim, 2014). Hiljade novih miRNK se otkrije svake godine u različitim organizmima (Xie i Steitz, 2014; Baumgart i sar., 2017) i prema bazi podataka za miRNK, miRbase (<https://www.mirbase.org/>), oko 2 000 funkcionalno različitih miRNK je identifikovano kod čoveka, do danas. miRNK su modulatori koji regulišu ekspresiju gena na post-transkripcionom nivou regulišući stabilnost i translaciju iRNK, zbog čega su uključeni u skoro svaki biološki proces kao što su regulacija deobe ćelija, diferencijacija, rast i apoptoza (Friedman i Jones, 2009).

Geni koji kodiraju miRNK se nalaze širom genoma i mogu biti lokalizovani u intergenskim ili intragenskim regionima. U nukleusu, geni za miRNK se prepisuju aktivnošću enzima RNK polimeraze II u primarne miRNK transkripte (pri-miRNK) dužine više od 1kb (Wahid i sar., 2010). Pri-miRNK formira dvolančanu strukturu ukosnice, koja se sastoji od drške i petlje i kodira jednu ili dve zrele miRNK. Drška pri-miRNK se sastoji iz donjeg funkcionalnog dela, dugačkog 11 baznih parova i gornjeg funkcionalnog dela, dugačkog 22 bazna para. Ovu pri-miRNK prepoznaje mikroprocesorski kompleks i seče je kako bi nastala prekursorska miRNK (pre-miRNK), dužine oko 70 nukleotida. Mikroprocesorski kompleks čine Drosha i DGCR8. Kompleks prepoznaje pri-miRNK transkript pomoću DGCR8 proteina, dok Drosha seče pri-miRNK između donjeg i gornjeg funkcionalnog dela drške, tj. 11 baznih parova od početka dvolančane RNK (Ha i Kim, 2014).

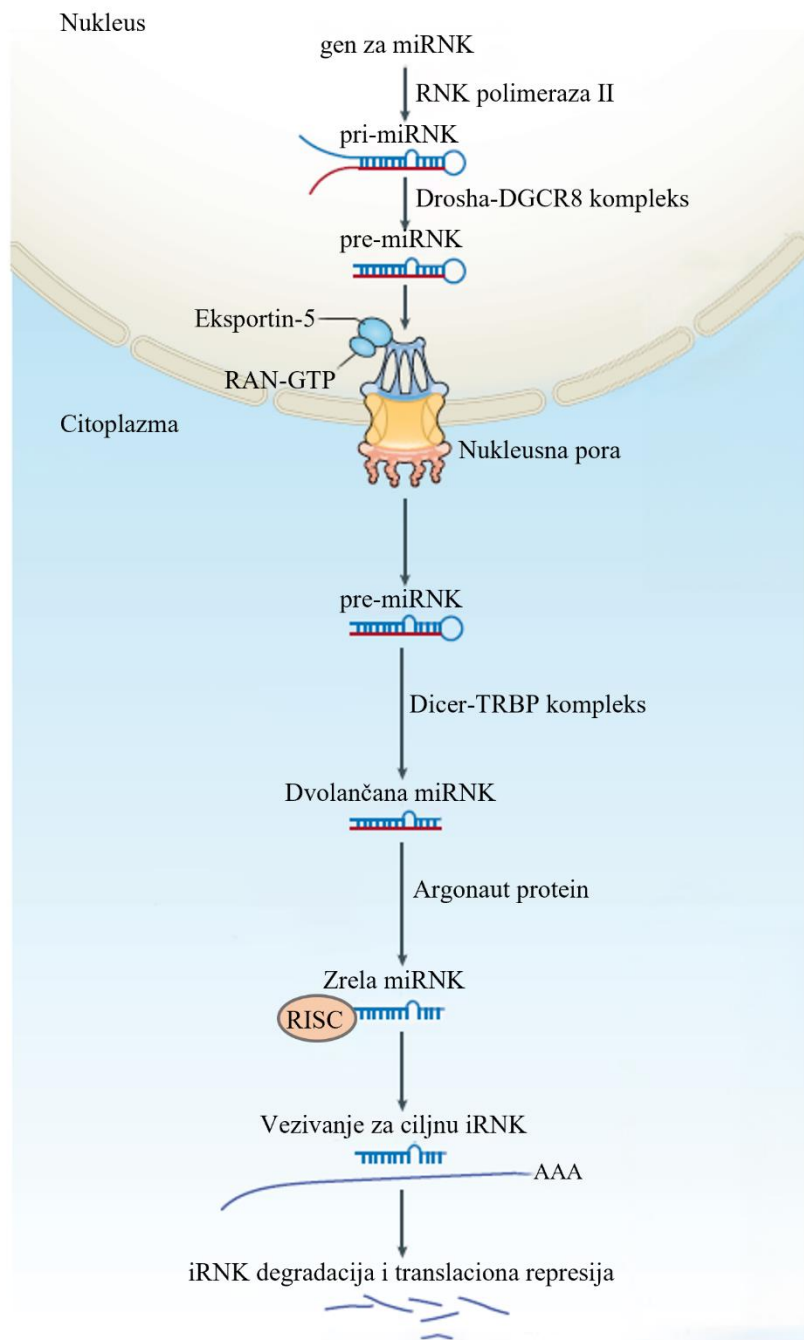
Pre-miRNK se eksportuje u citoplazmu pomoću proteina transportera, eksportin 5. Ovaj transporter prepoznaje 2 nukleotida koja se nalaze na 3' kraju pre-miRNK, koji je nastao katalitičkom aktivnošću enzima Droshe. Eksportin 5 radi samo u prisustvu GTP vezujućeg nuklearnog proteina Ran-GTP. Ran postoji u dva oblika u zavisnosti od lokacije, RanGTP u nukleusu i RanGDP u citoplazmi. Kompleks koji se sastoji od eksportina 5, RanGTP-a i pre-miRNK, se kasnije transportuje kroz nukleusnu poru (Melo i Esteller, 2014).

U citoplazmi, dalja obrada pre-miRNK se dešava pomoću kompleksa Dicer-TRBP, kako bi se dobila dvolančana miRNK. Dicer prepoznaje pre-miRNK pomoću PAZ domena (Lau i sar., 2012) koji stupa u interakciju sa jednolačanim 3' krajem dužine 2 nukleotida (Tsutsumi i sar., 2011). Dicer se zatim vezuje za region petlje pre-miRNK da bi je isekao na fiksnoj lokaciji brojanjem 21-25 nukleotida od 3' terminalnog regiona (Ha i Kim, 2014) (Slika U3).

Nekoliko RNK vezujućih proteina regulišu funkcije Dicera. TRBP je kofaktor koji pomaže u vremenski efikasnoj Dicer obradi i prepoznaje i razlikuje pre-miRNK od mešavine RNK molekula prisutnih u okruženju (Fareh i sar., 2016). Nakon obrade pre-miRNK, dvolančana miRNK ima jednolančane 3' krajeve koji su nastali aktivnošću Droshe i Dicer-a (Khan i sar., 2019).

Dvolančana miRNK sadrži dva lanca od kojih će nastati po jedna zrela miRNK, a formira kompleks sa proteinom Argonaut (Ago) kako bi se formirao utišavajući kompleks miRISC. Formiranje miRISC-a čine dva odvojena koraka. U prvom koraku, vezivanje dvolančane miRNK za proteine familije Argonaut kako bi se formirao pre-RISC, dok se u drugom koraku, dvolančana miRNK odvija unutar Ago proteina, kako bi nastale dve zrele miRNK koje se obeležavaju sufiksom 5p ukoliko potiču od 5' lanca i 3p ukoliko potiču od 3' lanca. Jedan od ova dva lanca je obično biološki aktivniji i zastupljeniji (engl. *guide*) od drugog lanca (engl. *passenger*), a selekcija se vrši na osnovu termodinamičke stabilnosti i sastava nukleotida na 5' kraju (Noland i Doudna, 2013). Lanac koji je manje stabilan i kod koga se uracil nalazi na 5' kraju se selektuje kao *guide* lanac, dok lanac koji je termodinamički stabilan i sadrži citozin na 5' kraju se selektuje kao *passenger* lanac (Meijer i sar., 2014).

miRNK regulišu ekspresiju ciljnih gena indukcijom degradacije ciljne iRNK, deadenilacije ili translacione represije. Specifičnost vezivanja miRISC-a za ciljnu iRNK proizilazi iz interakcije regiona "semena" (engl. *seed region*) miRNK sa 3'UTR regionom ciljne iRNK (Song i sar., 2012). Region semena obuhvata nukleotide od 2. do 8. i ključan je za interakciju. Međutim, dodatno sparivanje na 3' kraju doprinosi stabilnosti i specifičnosti interakcije miRNK i ciljne iRNK, posebno u regionu miRNK od nukleotida 13 do 16 (Broughton i sar., 2016). Region semena je komplementaran sekvencama na 3'UTR regionu ciljne iRNK, poznatim kao miRNK vezivna mesta (engl. *miRNA response elements* – MREs). Potpuno komplementarna interakcija miRNK i MRE indukuje aktivnost Ago endonukleaze i dovodi do degradacije iRNK (Jo i sar., 2015). Većina interakcija miRNK i MRE nisu u potpunosti komplementarne, sprečavajući aktivnost endonukleaze Ago. Tada, Ago2 deluje kao posrednik interferencije iRNK, a formiranje utišavajućeg miRISC kompleksa počinje regrutovanjem GW182 proteina. Interakcija između GW182 i proteina koji se u citoplazmi veže za poli(A) rep (engl. *poly(A)-binding protein* – PABPC) dovodi do efikasne dedenilacije (Jonas i Izaurralde, 2015). Bez obzira kojim mehanizmom miRNK regulišu ciljne gene, pokazano je da se nivo iRNK snižava.



Slika U3. Šematski prikaz biogeneze miRNK. Geni za miRNK se prepisuju od strane RNK Polimeraze II u pri-miRNK koju prepoznaje mikroprocesorski kompleks (Droscha i DGCR8) koji endonukleolitički seče i obrađuje pri-miRNK u pre-miRNK. Pre-miRNK se eksportuje u citoplazmu uz pomoć eksportina 5 u kompleksu sa Ran-GTP. Dicer zajedno sa svojim kompleksom prepoznaje i seče pre-miRNK da bi formirao dvolančanu miRNK. Dobijena dvolančana miRNK se veže za Argonaut proteine koji odmotavaju dvolančanu miRNK da bi selektovao *passenger* lanac kako bi se formirao miRISC. Preuzeto i adaptirano iz Rupaimoole i Slack, 2017.

1.7. Manipulacija nivoa miRNK korišćenjem miRNK mimika

Fiziološke promene u ekspresiji miRNK imaju ključnu ulogu u finom podešavanju složene regulatorne mreže genoma. Sa druge strane, u mnogim bolestima, izmenjena ekspresija miRNK takođe zauzima centralno mesto u modifikovanju ekspresije proteina tokom patoloških procesa u ćeliji (Subramanian i Steer, 2019). Osim što imaju dijagnostički potencijal kroz detekciju izmenjenog nivoa ekspresije miRNK, miRNK poseduju i terapijski potencijal kroz ciljanu manipulaciju njihove ekspresije, posebno onih koje su ključne za fenotip određene bolesti (Huang, 2017). Za modifikovanje nivoa miRNK, obično se koriste miRNK mimike i inhibitori. miRNK mimike se mogu hemijski sintetisati kao oligonukleotidi prema sekvencama endogene miRNK, a simuliraju povećanje ekspresije miRNK. Ove miRNK mimike funkcionišu na način koji je sličan endogenim miRNK, formirajući miRISC kompleks i utičući na ekspresiju ciljnih gena (Martinez i sar., 2002). Pošto uvođenje miRNK mimika u ćeliju dovodi do povećanja nivoa molekula koji su već prisutni u ćeliji, smatra se da su bezbedne za ćeliju i da ne ispoljavaju toksične efekte.

Za uspešnu terapiju koja je zasnovana na miRNK, neophodno je sveobuhvatno razumevanje njihovih molekularnih efekata i njihovog funkcionisanja unutar pojedinačnih ćelija. Plejotropni efekti miRNK u regulatornim mrežama se smatraju glavnim izazovima za terapiju koja je zasnovana na miRNK pristupu (Zhang i Zhu, 2021). Detaljna i sveobuhvatna funkcionalna karakterizacija miRNK kandidata je neophodan preduslov za njihovu terapijsku upotrebu. Pored identifikacije i potvrde miRNK kandidata za terapijsku modifikaciju, potrebna je implementacija eksperimentalnih strategija koje omogućavaju efikasnu validaciju njihovih ciljnih gena (Kern i sar., 2020). Potvrda miRNK ciljnih gena može se obezbediti analizom ekspresije miRNK i ciljne iRNK, kao i ciljnog proteina u ćelijama od interesa (Diener i sar., 2020; Sindhu i sar., 2021). Dalja potvrda ciljnih gena miRNK može se dobiti uvođenjem miRNK transfekcijom u ćelije od interesa i analizom efekta na nivoe iRNK ciljnih gena i proteina koje kodiraju ove iRNK (Riolo i sar., 2020). *In vitro* manipulacija ekspresijom miRNK pomoću CRISPR/Cas9 tehnologije (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR - associated protein 9*), tj. generisanje modela ćelijskih nokaut linija za gene miRNK mogu pomoći da se potvrde veze između miRNK, njenih interakcija sa ciljnim genima i fenotipovima (Jacquet i sar., 2021; Iwakawa i Tomari, 2022). Posebna pažnja se mora posvetiti i ćelijskoj pozadini i regulatornim efektima drugih miRNK (Gebert i MacRae, 2019).

Nekoliko lekova koji su zasnovani na miRNK mimicima je, do sada, ušlo u fazu kliničkog ispitivanja (Reid i sar., 2016; Beg i sar., 2017; Gallant-Behm i sar., 2019). Sva ova ispitivanja su pokazala određena poboljšanja u kliničkom ishodu lečenih pacijenata, ali su još uvek u toku da se proceni njihova dugoročna efikasnost i posebno bezbednost miRNK interferencije (Rupaimoole i Slack, 2017). Manipulacija nivoa miRNK korišćenjem miRNK mimika predstavlja moćan alat u istraživanju bioloških procesa i razvoju terapijskih strategija za različite bolesti. Pre nego što se ova tehnika primeni u kliničkoj praksi, potrebna su dalja istraživanja kako bi se bolje razumeli njeni mehanizmi delovanja i rizici.

1.8. Mikro RNK u CAKUT-u

Do danas, samo nekoliko studija je istraživalo miRNK u CAKUT-u (Bartram i sar., 2013; Medrano i sar., 2014; Jovanović i sar., 2016; Macak i sar., 2023). Na mišjim modelima kod kojih je nokautiran gen za Dicer demonstriran je značaj miRNK u CAKUT-u. Poremećaj biogeneze miRNK kod ovih miševa rezultirao je anomalijama u razvoju sličnim CAKUT-u i bubrežnom insuficijencijom (Bartram i sar., 2013). Medrano i saradnici (2014) su takođe na mišjem modelu pokazali da delecija miR-143/145 klastera dovodi do promene u ekspresiji 108 gena i hidronefroze

kod miševa. U integrativnoj studiji, kod pacijenata sa CAKUT-om ekspresija 78 gena je bilo promenjena (Jovanović i sar., 2018), a korišćenjem bioinformatičke analize kompletnog transkriptoma, identifikovana je i eksperimentalno validirana povišena ekspresija hsa-miR-144 u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na tkivo uretera zdravih kontrola (Jovanović i sar., 2016). Iako je pokazano da miRNK ima ulogu u razvoju bubrega i urinarnog sistema, istraživanje uloge miRNK u CAKUT-u je još uvek na početku.

Na osnovu podataka iz literature poznato je da CNV regioni značajno utiču na nivo miRNK ukoliko je gen za miRNK lokalizovan u okviru CNV regiona što miRNK čini funkcionalnim varijantama i kandidatima za dalje funkcionalne studije (Marcinkowska i sar., 2011). Opisano je da se oko 30% gena koji kodiraju miRNK nalazi u humanim CNV regionima, što može značajno uticati na nivo miRNK i naknadno uticati i na nivo ekspresije nizvodno regulisanih gena (Marcinkowska i sar., 2011). Prethodno je pokazano da promene u ekspresiji gena za miRNK mogu modifikovati ispoljavanje kompleksnih bolesti kao što su kancer i neurokognitivni poremećaji (Vaishnavi i sar., 2013; Qiao i sar., 2013; Xia i sar., 2018; Vischioni i sar., 2022). Varijacije u ekspresiji gena ovih funkcionalno relevantnih miRNK mogu da modulišu fenotip ili da predstavljaju predispoziciju za neki od navedenih fenotipova.

Do sada nijedna studija nije imala za cilj da istraži miRNK u kontekstu genetičkih uzročnika koji su lokalizovani u CNV regionima. Potencijal CNV regiona da regulišu nivo miRNK i relativno visok procenat pacijenata sa CAKUT-om kod kojih je identifikovan retki CNV region zahteva dalje istraživanje efekta promene u ekspresiji miRNK na ciljne gene, ključne za razvoj bubrega i urinarnog sistema. Zbog toga je glavni fokus istraživanja u okviru ove disertacije bio izučavanje miRNK u retkim CNV regionima koji su asocirani sa nastankom CAKUT-a. Kao rezultat toga, problem koji će ova teza rešiti jeste nedostatak razumevanja kako promene u ekspresiji miRNK koje su povezane sa CNV regionima utiču na procese ključne za normalan razvoj bubrega i urinarnog trakta i kako na taj način doprinose nastanku CAKUT-a. Takođe, imajući u vidu da je sve više kliničkih studija u kojima se ispituje terapijski efekat restitucije nivoa miRNK sa izmenjenom ekspresijom u različitim bolestima, rezultati ove studije bi mogli da ukažu na nove miRNK kao potencijalne ciljne molekule predikcije, dijagnostike i lečenja CAKUT-a, u cilju prevencije gubitka funkcije bubrega koja je glavni otežavajući faktor u životu dece i odraslih pacijenata sa CAKUT-om.

2. Ciljevi rada

Na osnovu podataka iz literature, da retke strukturne varijante u genomu dovode do razvoja CAKUT-a, kao i da ove varijante mogu značajno uticati na nivo miRNK čiji su geni lokalizovani u njima, postavljena je sledeća hipoteza:

Retki CNV regioni koji su asocirani sa nastankom CAKUT-a sadrže gene za miRNK, što može uticati na nivo miRNK koje mogu modifikovati ekspresiju gena u ključnim biološkim procesima odgovornim za normalno razviće bubrežno-urinarnog sistema, a što može rezultovati nastankom CAKUT-a.

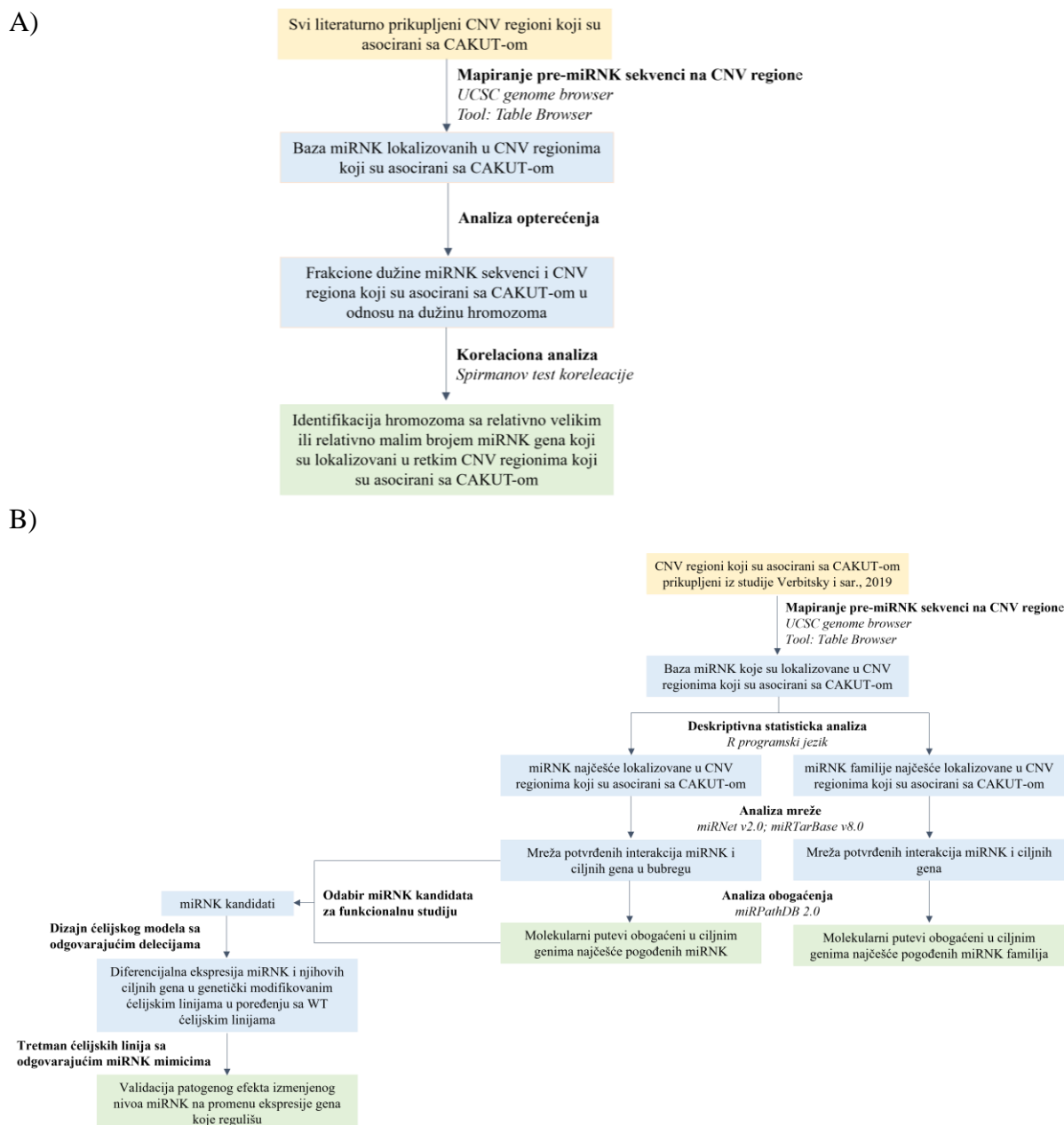
Potvrda ove hipoteze ukazala bi na, do sada neistražene potencijalne genetičke uzročnike u okviru CNV regiona i dala mogućnost da se molekuli miRNK koriste kao dijagnostički biomarkeri i terapijski agensi u tretmanu CAKUT-a.

U ovoj disertaciji postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Generisanje baze svih opisanih retkih CNV regiona identifikovanih kod pacijenta sa CAKUT-om, korišćenjem literature i javno dostupnih baza podataka.
2. Deskriptivna karakterizacija CNV regiona i mapiranih miRNK kroz protokole za analizu podataka velikog obima.
3. Bioinformatička karakterizacija miRNK i odabir miRNK koje potencijalno regulišu ključne procese u razviću bubrežno-urinarnog sistema.
4. Utvrđivanje nivoa odabranih miRNK kandidata nakon promene doze miRNK gena *in vitro* u ćelijskim linijama kod kojih je veštački generisan CNV region koji je asociran sa nastankom CAKUT-a.
5. Karakterizacija funkcionalnog efekta doze gena za miRNK na nivo transkripta gena koje odabrane miRNK regulišu, a koji učestvuju u ključnim biološkim procesima odgovornim za nastanak urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta.
6. Validacija patogenog efekta izmenjenog nivoa odabranih miRNK na promenu ekspresije gena koje regulišu kroz ponovno uspostavljanje nivoa miRNK transfekcijom miRNK mimika *in vitro*.

3. Materijal i metode

Dizajn i metodologija studije koja se bavi identifikacijom i karakterizacijom miRNK u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i funkcionalnom validacijom efekta retkog CNV regiona na ekspresiju miRNK kandidata i posledično na ekspresiju njihovih ciljnih gena asociranih sa CAKUT-om, su predstavljeni šematski (Slika M1).



Slika M1. Dizajn studije A) Šema analize opterećenja gena koji kodiraju miRNK retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om B) Šema analize identifikacije najčešćih miRNK i miRNK familija u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

3.1. Prikupljanje podataka o retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

Podaci o svim retkim CNV regionima koji su asocirani sa nastankom CAKUT-a prikupljeni su sistematičnom pretragom literature, nakon čega je generisana baza gde su podaci harmonizovani i uniformno organizovani kako bi dalja analiza podataka velikog obima bila moguća. U literaturi, koordinate retkih CNV regiona su bile izražene u odnosu na dva referentna genoma NCBI36/hg18 i GRCh37 (hg19). Upotrebom *Liftover* alata, USCS genome browser platforme izvršena je harmonizacija koordinata CNV regiona u GRCh37 (hg19) koordinate.

Tokom procesa prikupljanja podataka, primećeno je da su neke studije koje su uključene u analizu imale određene grupe pacijenata koji se preklapaju. U analizi koja je bila usmerena na identifikaciju miRNK koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, ova preklapanja bi mogla dovesti do prividno većeg broja gena koji kodiraju miRNK u retkim CNV regionima. Kako bi se prevazišla ova vrsta greške, studija identifikacije miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima je sprovedena na najkompleksnijoj studiji analize CNV regiona u CAKUT-u (Verbitsky i sar., 2019), koja je obuhvatala oko 3 000 pacijenata i oko 20 000 kontrola. Sa druge strane, analiza usmerena na procenu opterećenja gena koji kodiraju miRNK retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, pokazala je visok stepen robustnosti u kontekstu redundantnih informacija. Naime, u ovoj analizi CNV regiona istog pacijenta tretirani su kao jedinstveni CNV region budući da obuhvataju istu lokaciju na hromozomu. Na taj način, podaci iz svih ključnih studija koje su istraživale retke CNV regione u CAKUT-u (Sanna-Cherchi i sar., 2012; Westland i sar., 2015; Verbitsky i sar., 2015; Caruana i sar., 2015; Verbitsky i sar., 2019; Cai i sar., 2020) su bili uključeni u analizu opterećenja miRNK retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om.

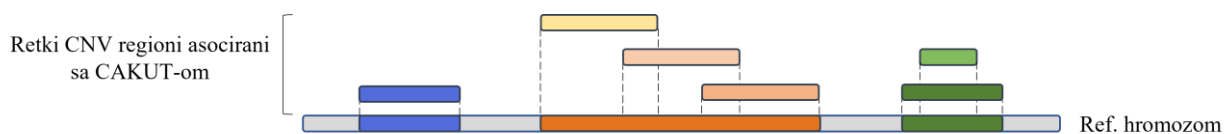
3.2. Opterećenje gena koji kodiraju miRNK retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

U svrhu ove analize, svi retki CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om, iz studija koje su istraživale retke CNV u CAKUT-u su bili uključeni (Sanna-Cherchi i sar., 2012; Westland i sar., 2015; Verbitsky i sar., 2015; Caruana i sar., 2015; Verbitsky i sar., 2019; Cai i sar., 2020). Analiza je obavljena odvojeno za dva tipa retkih CNV regiona, delecije i duplikacije. Obrada podataka je podrazumevala računanje sledećih parametara, kao što je prethodno opisano (Marralle i sar., 2014):

- (a) ukupna dužina svih poznatih pre-miRNK po hromozomu (L_{mir}) i kumulativna dužina svih retkih CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om po hromozomu (L_{cnv})
- (b) računanje odnosa R_{mir} ($R_{mir} = L_{mir}/\text{dužina hromozoma}$) i R_{cnv} ($R_{cnv} = L_{cnv}/\text{dužina hromozoma}$)
- (c) broj jedinstvenih miRNK lokusa uključenih u pojedinačne i preklapajuće retke CNV regione u CAKUT-u

Za računanje kumulativne dužine svih retkih CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om (L_{cnv}) po hromozomu, tri moguća scenarija su uzeta u obzir. U prvom scenariju, CNV region se ne preklapa ni sa jednim drugim CNV regionom i stoga je uzet u obzir u celini. U drugom scenariju, postoji preklapanje više CNV regiona, pa je uzet region između minimuma i maksimuma regiona koji se preklapaju. U trećem scenariju, jedan CNV region se potpuno preklapa sa drugim CNV regionom te su koordinate većeg CNV regiona uključene u jednačinu dok su se koordinate manjeg, preklapljenog CNV regiona isključene iz jednačine. Ukupna kumulativna dužina CNV regiona po hromozomu (L_{cnv}) bila je zbir odgovarajućih DNK regiona definisanih u prethodno opisanim scenarijima (Slika M2). Korišćenjem USCS genome browser platforme, alata *Table browser*,

izvršeno je bioinformatičko mapiranje miRNK sekvenci na ove retke CNV regione. Ovim procesom je dobijen broj jedinstvenih miRNK lokusa koji oslikava ukupno opterećenje gena koji kodiraju miRNK CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om.



Slika M2. Šematski prikaz tri moguća scenarija tokom računanja kumulativne dužine retkih CNV regiona identifikovanih kod pacijenata sa CAKUT-om. Prvi scenario (obežen plavom bojom), CNV region se ne preklapa ni sa jednim drugim CNV regionom. Drugi scenario (obežen narandžastom bojom), postoji preklapanje više CNV regiona, pa se u obzir uzima region između minimuma i maksimuma regiona koji se preklapaju. Treći scenario (obežen zelenom bojom), jedan CNV region se potpuno preklapa sa drugom CNV regionom i tako su samo koordinate većeg CNV regiona uključene u jednačinu.

Korelacija između broja jedinstvenih gena za miRNK koji se preklapaju sa retkim CNV regionima i dužine CNV regiona u odnosu na dužinu hromozoma (Rcnv odnos) je urađena da bi se ispitalo da li broj jedinstvenih gena koji kodiraju miRNK u okviru CNV regiona prati linearni trend u funkciji kumulativne dužine CNV regiona. Za svaki hromozom, analizirana je korelacija broja mapiranih gena koji kodiraju miRNK u odnosu na Rcnv odnos da bi se izračunali koeficijenti korelacije. Analize su rađene posebno za delecije i duplikacije korišćenjem neparametrijskog Spirmanovog (engl. *Spearman*) testa korelacije. Statistička analiza i generisanje grafikona urađene su korišćenjem softvera Prism v8 (GraphPad Software, Inc.).

3.3. Mapiranje i identifikacija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

Kako bi se detektovale miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, korišćeni su retki patogeni i uslovno patogeni CNV regioni identifikovani kod 153 pacijenta sa CAKUT-om (Verbitsky i sar., 2019). Bioinformatičko mapiranje miRNK sekvenci na retke CNV regione ovih pacijenata rađeno je pomoću USCS genome browser platforme, alata *Table browser* po sledećim parametrima: *clade: mammal; genome: human; assembly: hg19; group: genes and gene predictions; track: sno/miRNA; table: wgRna*. Na ovaj način je na osnovu već opisanih CNV regiona kod pacijenata sa CAKUT-om i mapiranja miRNK na ove regione formirana baza podataka tj. set miRNK koje su lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa pacijentima sa CAKUT-om. Primer ove baze je prikazan u Tabeli M1. Nakon mapiranja miRNK, izvršena je deskriptivna statistička analiza generisane baze mapiranih miRNK pomoću R programskog jezika, koristeći *sqldf* paket za izvršavanje SQL upita. Uzimajući u obzir da geni za miRNK koje pripadaju istoj miRNK familiji imaju sufikse u svojoj anotaciji (npr. *hsa-mir-548ar*, *hsa-mir-548e*, *hsa-mir-548f-2*), *stringr* paket je korišćen za uklanjanje anotacionih sufiksa u cilju identifikacije familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Ovakav pristup omogućava identifikaciju obogaćenja familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, gde su različiti članovi familije potencijalno prisutni kod malog broja pacijenata. Rezultati svih izvršenih selekcija su izvezeni u Excel fajl radi dalje analize.

Tabela M1. Prikaz ključnih parametara za deo baze retkih CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om i mapiranih miRNK

Studija	Pacijenti	Fenotip	Klinički značaj CNV regiona	Hromozom	Dužina (Mbp)	Početak CNV regiona	Kraj CNV regiona	miRNK	Tip CNV regiona
Verbitsky i sar., 2019	CAKUT135	AB	Uslovno patogen	Hromozom 11	8,246296	80715794	88962090	hsa-mir-4300	Delecija
Verbitsky i sar., 2019	CAKUT135	AB	Uslovno patogen	Hromozom 11	8,246296	80715794	88962090	hsa-mir-6755	Delecija
Verbitsky i sar., 2019	CAKUT135	AB	Uslovno patogen	Hromozom 11	8,246296	80715794	88962090	hsa-mir-3166	Delecija
Verbitsky i sar., 2019	CAKUT135	AB	Uslovno patogen	Hromozom 11	2,055945	93023382	95079327	hsa-mir-1304	Delecija
Sanna-Cherchi i sar., 2012	MCD_3	AB	Uslovno patogen	Hromozom 12	7,62	126104047	133779461	hsa-mir-4419b	Duplikacija
Sanna-Cherchi i sar., 2012	MCD_3	AB	Uslovno patogen	Hromozom 12	7,62	126104047	133779461	hsa-mir-3612	Duplikacija
Sanna-Cherchi i sar., 2012	MCD_3	AB	Uslovno patogen	Hromozom 12	7,62	126104047	133779461	hsa-mir-6763	Duplikacija
Cai i sar., 2020	G9727	AB	Patogen	Hromozom 17	1,4	34822465	36311009	hsa-mir-2909	Delecija
Cai i sar., 2020	G9727	AB	Patogen	Hromozom 17	1,4	34822465	36311009	hsa-mir-378j	Delecija
Verbitsky i sar., 2019	CAKUT13	AB	Patogen	Hromozom 1	2,446708	145394955	147841663	hsa-mir-6736	Delecija
Verbitsky i sar., 2019	CAKUT13	AB	Patogen	Hromozom 1	2,446708	145394955	147841663	hsa-mir-5087	Delecija

Koordinate CNV regiona su harmonizovane u GRCh37 (hg19) koordinate. U cilju lakše analize, podaci pacijenta u tabeli su ponavljani za svaku miRNK. AB – Anomalije bubrega.

3.4. Bioinformatička analiza miRNK i miRNK familija koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

U cilju funkcionalne interpretacije miRNK i familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, urađena je bioinformatička analiza mreža molekularnih interakcija. Arbitrarna granica je postavljena za prvih deset miRNK i familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima. Korišćenjem miRNet v2.0 alata (Chang i sar., 2020) konstruisana je mreža interakcija miRNK sa ciljnim genima koristeći miRTarBase v8.0 kao resurs validiranih interakcija miRNK i ciljnih gena. U slučaju miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima mreža je generisana uzimajući u obzir interakcije koje su opisane u tkivu bubrega. Generisanje mreže interakcija članova familija kod kojih je uočeno obogaćenje je urađeno uzimajući u obzir sve opisane interakcije.

Pored vizuelizacije složenih odnosa molekula miRNK i njihovih ciljnih gena, izvršena je i analiza obogaćenja (engl. *enrichment*) ciljnih gena, korišćenjem KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) baze podataka i hipergeometrijskog testa kao algoritma za izračunavanje obogaćenja. Analiza centralnosti za identifikaciju centralnih čvorova u mreži izvršena je korišćenjem mera centralnosti:

- *Degree centrality* koja se određuje kao broj direktnih suseda svakog čvora u mreži.
- *Betweenness centrality* određenog čvora je proporcionalna broju najkraćih puteva između dva čvora u mreži koji prolaze kroz taj čvor, u odnosu na ukupan broj najkraćih puteva koji povezuje sve ostale čvorove.

3.5. Čelijske linije

U okviru ove studije korišćena je permanentna čelijska linija humanog embrionalnog bubrega HEK293 (engl. *Human Embryonic Kidney 293*) (ATCC br. CRL-1573). Ova linija pokazuje epitelnu morfologiju, a čelije su obično nepravilnog oblika i često imaju strukture koje podsećaju na dendrite.

Da bi se uspostavio *in vitro* model u okviru ove studije, dizajnirana su dva modela čelijskih linija koje oslikavaju deleciju gena koji kodiraju miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om (*MIR484* i *MIR185*):

1. HEK293 čelijska linija sa heterozigotnim nokautom gena *MIR484* (GeneID: 619553) (HEK293 *MIR484* KO^{het})
2. HEK293 čelijska linija sa homozigotnim nokautom gena *MIR185* (GeneID: 406961) (HEK293 *MIR185* KO^{hom})

Oba *in vitro* modela čelijskih linija (HEK293 *MIR484* KO^{het} i HEK293 *MIR185* KO^{hom}) su generisani od strane kompanije Creative Biogene (Shirley, NY, SAD). Navedene čelijske linije su generisane primenom tehnologije CRISPR/Cas9, koja podrazumeva ciljanu modifikaciju određene sekvence DNK u ćeliji. CRISPR/Cas9 sistem sastoji se od dve komponente, Cas9 enzima i specifičnog molekula RNK koji se naziva vodeća RNK (engl. *single guide RNA* – sgRNA) koja specifično prepoznaje deo molekula DNK od interesa. Vodeća RNK se vezuje za enzim Cas9 i navodi ga da seče DNK na specifičnom genomskom lokusu na osnovu komplementarnosti sekvenci, što dovodi do prekida dvolančane DNK. Vodeća RNK je dizajnirana prema sekvenci *MIR484* i *MIR185* od strane Creative Biogene-a (Shirley, NY, SAD), nakon čega je zajedno sa enzimom Cas9 transfekcijom uvedena u čelije HEK293. Tri vodeće RNK su dizajnirane tokom dizajniranja eksperimenta utišavanja gena za miRNK, međutim samo jedna od njih je korišćena za

resuspendovane i prebrojane pomoću hemocitometra, a broj živih ćelija određivan je po sledećoj formuli:

$$\frac{\text{Prosečan broj izbrojanih ćelija}}{5 \text{ (broj polja u kojima su ćelije prebrojane)}} \times 5 \text{ (korekcija za dodavanje 1:5 razblaženja Trypan Blue)} \times 10^4 = \text{Broj ćelija/ml}$$

Nakon brojanja, ćelije su zasejavane u odgovarajućem razblaženju.

3.7. Sekvenciranje nove generacije

Sinteza biblioteka malih RNK za sekvenciranje nove generacije (engl. *Next-Generation Sequencing* – NGS) urađena je korišćenjem SMARTer smRNA-Seq kit-a (Takara Bio Inc., CA, SAD) na uzorcima RNK koja je izolovana iz dve replike sve tri ćelijske linije (HEK293 WT, HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 MIR185 KO^{hom}). Ukratko, 500 ng ukupne RNK je uključeno u korak poliadenilacije nakon čega je usledila sinteza cDNK. Kontrolna RNK - miR163s je korišćena kao pozitivna kontrola uspešne sinteze biblioteke. Negativna kontrola, tj. reakcija sinteze biblioteke koja nije sadržala RNK, je takođe uvedena u cilju identifikacije potencijalne kontaminacije usled velikog broja PCR ciklusa tokom sinteze biblioteke.

Koncentracija RNK koja je korišćena za sintezu biblioteka je pažljivo odabrana kako bi broj PCR ciklusa koji su preporučeni za pripremu biblioteke kontrolne RNK - miR163s (12 ciklusa amplifikacije) i broj ciklusa za sintezu biblioteke ispitivanih uzoraka bio jednak. Indeksiranje je rađeno po preporukama Illumina TruSeq® CD dual index pooling guide priručnika (Illumina Index Adapters Pooling Guide). Nakon što je cDNK amplifikovana, adapteri su dodati kroz PCR reakciju u skladu sa prethodno isplaniranom strategijom indeksiranja. Produkti PCR reakcije su prečišćeni korišćenjem NucleoSpin Gel i PCR Clean-Up kit-a (MACHEREY-NAGEL, Düren, Nemačka). Validacija uspešnosti sinteze biblioteka uzoraka, pozitivne i negativne kontrole je urađena korišćenjem Qubit 3 fluorometra i Qubit dsDNA HS Assay kit-a.

Nakon validacije uspešne sinteze biblioteka, izvršena je selekcija frakcije biblioteke koja sadrži male RNK korišćenjem AMPure XP Beads reagensa (Beckman Coulter). Nakon više koraka selekcije frakcije malih RNK, biblioteke su resuspendovane u Tris puferu i čuvane na –20°C do sekvenciranja. Koncentracija biblioteka je izračunata korišćenjem *Illumina Nanomolar Conversion calculator* koristeći parametar od 300bp kao prosečnu veličinu biblioteke. Biblioteke su razblažene i združene u finalnoj koncentraciji od 70 pM.

Združene biblioteke su sekvencirane korišćenjem Illumina iSeq100™ sistema sa konfiguracijom sekvenciranja od 1 × 51 bp, i projekcijom od oko 3 000 000 sirovih *read*-ova po uzorku. Tokom sekvenciranja, vršen je monitoring parametara primarne analize korišćenjem Illumina Sequencing Analysis (SAV) softvera kako bi se utvrdilo da su performanse sekvenciranja u skladu sa SMARTer smRNA-Seq Kit for Illumina (Takara Bio, Shiga, Japan) protokolom. Nakon završenog procesa sekvenciranja, ispitan je kvalitet indeksiranja (engl. *indexing QC*) u cilju provere ravnomernog združivanja biblioteka. Generisanje FASTQ datoteka izvršeno je na Illumina BaseSpace cloud platformi.

Za kontrolu kvaliteta sirovih podataka dobijenih sekvenciranjem korišćen je mirnaQC alat za komparativnu kontrolu kvaliteta miRNA-seq podataka (Aparicio-Puerta i sar., 2020) kako bi se utvrdio prinos sekvenciranih podataka sa zadovoljavajućim kvalitetom, i prisustvo kontaminacije drugim RNK fragmentima koji ne potiču od miRNK. mirnaQC alat zaobilazi postavljanje arbitrarnih parametara, upoređujući podatke urađenog eksperimentima sa podacima dobijenim u više od 36 000 sekvenciranih uzoraka miRNK.

Nakon uspješne kontrole kvaliteta sekvenciranih podataka sekundarna i tercijarna analiza su izvršene korišćenjem sRNA toolbox alata (<https://arn.ugr.es/srnatoolbox/>) (Aparicio-Puerta i sar., 2022). Ukratko, FASTQ datoteke su iskorišćene za preprocesuiranje i poravnanje *read*-ova. Za anotaciju miRNK, kao referentna baza, korišćena je miRBase release 22.1. Obrada *read*-ova je izvršena u skladu sa preporukama protokola SMARTer™ metode koja uključuje iterativno sečenje 5' kraja i iterativno poravnanje *read*-ova prema sekvenci genoma u maksimum 4 turnusa. Adapterska sekvenca koju je bilo neophodno identifikovati je glasila AAAAAAAAAAAAAA, dok je minimalna dužina poravnate adapterske sekvence 10. Minimalni prihvatljiv broj odstupanja od poravnanja adapterske sekvence je bio 1. Poravnanje je izvršeno korišćenjem osnovnih parametara sRNAbench alata.

sRNAbench vrši identifikaciju diferencijalno eksprimiranih miRNK na osnovu konsenzusa više algoritama za određivanje diferencijalne ekspresije. U ovoj studiji, bilo je neophodno da bar dva od 4 upotrebljena algoritma budu u skladu, tj. identifikuju diferencijalnu ekspresiju iste miRNK između ispitivanih grupa: DESeq (Anders i Huber, 2010), DESeq2 (Love i sar., 2014), edgeR (Robinson i sar., 2010), NOISeq (Tarazona i sar., 2015).

3.8. Selekcija miRNK kandidata i njihovih ciljnih gena

Na osnovu analize mreže interakcija miRNK na koje najčešće utiču retki CNV regioni koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena, kao i na osnovu molekularnih puteva koji su obogaćeni u ciljnim genima miRNK, hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p su odabrane kao miRNK kandidati.

Po pet ciljnih gena kandidata sa potencijalnom ulogom u CAKUT-u je odabrano za validaciju efekta retkog CNV regiona na izmenjenu ekspresiju hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p.

Na osnovu analize mreže interakcija miRNK na koje najčešće utiču retki CNV regioni koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena, kao i na osnovu istraživanja literature određeni su geni kandidati za funkcionalnu studiju. Ciljni geni hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p, koji su bili uključeni u najveći broj značajno obogaćenih puteva (ćelijski ciklus, putevi u kancerogenezi, signalni put neurotrofina) su bili od prioriteta, prema topologiji mreže i istraživanju literature.

Što se tiče topologije mreže, istraživani su geni kandidati koji su ciljni geni obe odabrane miRNK. *MDM2* je uključen u najveći broj prethodno opisanih obogaćenih puteva, pa je odabran kao ciljni gen i hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p. *CDC42* koji je takođe uključen u veliki broj prethodno opisanih obogaćenih puteva, odabran je kao ciljni gen hsa-miR-185-5p. *RHOA* je bio treći gen odabran iz mreže interakcija miRNK i njihovih ciljnih gena. *RHOA* je bio uključen u više opisanih puteva uključujući signalni put neurotrofina gde igra ključnu ulogu u prenosu signala važnom u ranoj nefrogenezi (Fedou i sar., 2020), pa je odabran kao ciljni gen hsa-miR-185-5p. Pored toga, istraživanjem da li mreža sadrži ranije povezane, visoko penetrantne gene koji dovode do nastanka CAKUT-a, identifikovan je *PKD1*, koji je odabran kao ciljni gen obe miRNK.

Dodatna četiri ciljna gena (*APAF1*, *FIS1*, *ATF6* i *NOTCH3*) odabrana su kroz istraživanje literature kao geni kandidati uključeni u procese asocirane sa CAKUT-om van značajno obogaćenih puteva identifikovanih u analizi mreže interakcija miRNK i njihovih ciljnih gena (Lee i sar., 2004; Alirol i sar., 2006; Chiang i sar., 2011; Djudjaj i sar., 2012; Chung i sar., 2016; Shakeri i sar., 2017; Mukherjee i sar., 2019; Yuan i sar., 2020).

Apoptoza ima važnu ulogu u razviću bubrega i urinarnog trakta (Stewart i sar., 2011), dok je izmenjena funkcija apoptotskih procesa primećena kod određenih fenotipova CAKUT-a (Kajbafzadeh i sar., 2006). Izmenjena ekspresija gena uključenih u apoptotske procese može dovesti

do čitavog fenotipskog spektra CAKUT-a tokom ranog razvoja. Tako je *APAF1* izabran zbog njegove centralne uloge u procesu apoptoze (Shakeri i sar., 2017), kao ciljani gen hsa-miR-484. Mitohondrije mogu da učestvuju u procesu apoptoze kao odgovor na stres endoplazmatičnog retikuluma (ER). Interakcija između ER i mitohondrija ukazuje na ključnu ulogu njihove interakcije u kontroli apoptoze (Giamogante i sar., 2021). FIS1, protein koji kontroliše deobu mitohondrija, takođe je uključen u apoptozu (Lee i sar., 2004; Alirol i sar., 2006). Funkcioniše tako što prenosi apoptotske signale od ER do mitohondrija (Iwasawa i sar., 2011), zbog čega je odabran kao ciljani gen hsa-miR-484. *ATF6* je odabran kao ciljani gen hsa-miR-185-5p zbog svoje povezanosti sa ER stresom i disfunkcijom bubrega (Chiang i sar., 2011; Yuan i sar., 2020). Kada dođe do ER stresa, on pokreće aktivaciju ATF6 koji reguliše ekspresiju CHOP, centralnog posrednika apoptoze izazvane ER stresom (Lenna i Trojanowska, 2012).

Notch signalizacija ima značajnu ulogu u nefrogenezi (Djudjaj i sar., 2012; Chung i sar., 2016; Mukherjee i sar., 2019) i brojne studije ukazuju na uključenost NOTCH3 u različitim bolestima bubrega (El Machhour i sar., 2015; Huang i sar., 2018; Idowu i sar., 2018), zbog čega je *NOTCH3* odabran kao ciljani gen hsa-miR-484.

3.9. Tranzijentna transfekcija ćelija

Nakon uspostavljanja ćelijskih kultura, izvršena je *in vitro* transfekcija miRNK mimika u cilju analize efekta ponovnog uspostavljanja nivoa miRNK na ekspresiju ciljnih gena kandidata. Jedan dan pre transfekcije, ćelije su zasejane u medijumu bez antibiotika, na gustini od $1,5 \times 10^5$ ćelija po bunariću na ploču koja je imala 6 bunarića. Nakon toga, 50nM miRNK mimike je transfekcijom uvedeno u ćelije korišćenjem Lipofectamine RNAiMax reagensa (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) prema protokolu proizvođača. Nakon 24h, medijum sa reagensom za transfekciju je zamenjen svežim DMEM medijumom. Ćelije su sakupljene 24h nakon zamene medijuma.

Tretman miRNK mimikama je izvršen po sledećim postavkama:

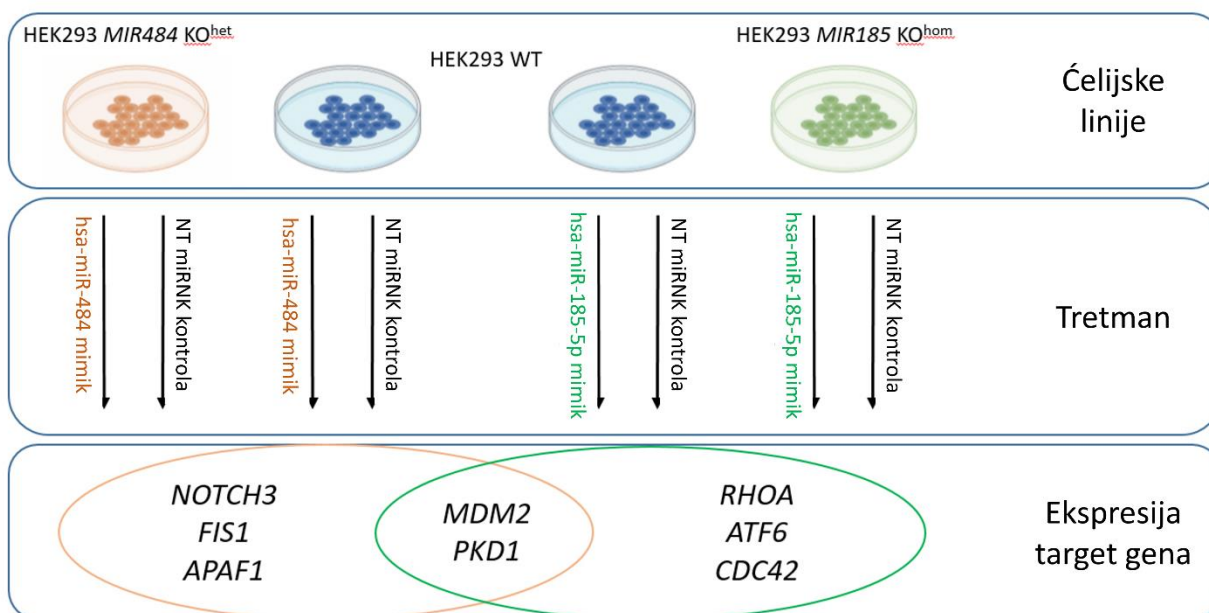
-hsa-miR-185-5p mimika (mirVana™ miRNA Mimic; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD) je transfekcijom uvedena u HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT ćelijske linije.

-hsa-miR-484 mimika (mirVana™ miRNA Mimic; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD) je transfekcijom uvedena u HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 WT ćelijske linije.

-miRNK mimika za koju je poznato da ne utiče na ekspresiju gena u humanim ćelijama (engl. *Non-targeting miRNA mimic*) (NT miRNK kontrola) (mirVana™ miRNA Mimic; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD) je transfekcijom uvedena u sve istraživane ćelijske linije (HEK293 MIR484 KO^{het}, HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT) u svojstvu kontrolnog tretmana (Slika M4).

-miRNK mimika čiji je ciljani gen *GAPDH* (Pozitivna kontrola) (mirVana™ miRNA Mimic, Positive Control #2; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD) je transfekcijom uvedena u sve ispitivane ćelijske linije u svojstvo pozitivne kontrole i potvrde uspešne procedure transfekcije.

Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu.



Slika M4. Šematski prikaz tretmana ćelijskih linija sa odgovarajućim miRNA mimikama. HEK293 ćelijska linija sa heterozigotnim nokautom gena *MIR484* (HEK293 *MIR484* KO^{het}) i HEK293 ćelijska linija sa homozigotnim nokautom gena *MIR185* (HEK293 *MIR185* KO^{hom}) korišćene su kao modeli efekta retkih CNV regiona na aktivnost miRNA. Ćelijske linije su tretirane sa odgovarajućim miRNA mimikama (hsa-miR-484 ili hsa-miR-185-5p mimika) i mimikom koji nema target u humanim ćelijama (NT miRNA kontrola). Dva gena, *MDM2* i *PKD1*, su odabrana kao ciljni geni i hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p. Dodatna tri gena kandidata sa potencijalnom ulogom u CAKUT-u su odabrana za svaku pojedinačnu miRNA. Kao ciljni geni kandidati za hsa-miR-484 odabrani su *FIS1*, *APAF1* i *NOTCH3*, dok su kao ciljni geni kandidati za hsa-miR-185-5p odabrani *CDC42*, *RHOA* i *ATF6*. Oba tretmana miRNA mimikama takođe su izvedena na ćelijskoj liniji HEK293 WT. Ekspresija ciljnih gena za tretmane miRNA mimikama je upoređena sa odgovarajućim tretmanima NT miRNA kontrole u okviru istih ćelijskih linija kako bi se istražio odgovor ekspresije ciljnih gena na tretman hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p mimikama.

3.10. Ekstrakcija ukupne RNK iz kultivisanih ćelija

Pre same izolacije ukupne RNK, medijum je uklonjen iz flaskova, a ćelije su isprane hladnim PBS-om i sakupljene pomoću strugalica (engl. *scrapers*). Ukupna RNK je ekstrahovana iz tri replike, tri ćelijske linije sa TRI-Reagentom po protokolu proizvođača (Ambion, Austin, SAD). Uzorci RNK rastvoreni su u vodi bez nukleaza (Ambion Nuclease Free Water) i čuvani na -80°C.

Koncentracija izolovane RNK je merena na NanoDrop ND-1000 spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD). Osim koncentracije, očitavan je i odnos apsorbanci izmerenih na 260 i 280nm (A260/A280) i 260nm i 230nm (A260/A230) koji ukazuju na čistoću uzorka. Vrednosti u opsegu 1.8-2.2 ukazuju na čistoću RNK koja je prihvatljiva za dalji rad.

3.11. Reverzna transkripcija

Pre reverzne transkripcije svih RNK sa poliA repom, rađena je digestija genomske DNK iz uzoraka enzimom dezoksiribonukleaza I (DNaza I) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD) po uputstvu proizvođača, kako bi se uklonili eventualni ostaci genomske DNK. Ovaj enzim ima endonukleaznu aktivnost i hidrolizuje fosfodiesterne veze jednolančane i dvolančane DNK. Nakon dodavanja enzima DNaze I i 10X Reaction Buffer with MgCl₂, smeša je inkubirana 30min na 37°C. Inaktivacija enzima se postiže dodavanjem EDTA, a reakciona smeša se inkubira 10min na 65°C.

Prevođenje svih RNK sa poliA repom u cDNK urađeno je pomoću RevertAid First strand cDNA synthesis kit-a sa oligo-dT₁₈ prajmerima po uputstvu proizvođača (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD). Količina RNK koja je korišćena u reakciji reverzne transkripcije bila je 1µg. Sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije reverzne transkripcije su prikazani u Tabeli M2.

Reverzna transkripcija miRNK u jednolančanu cDNK je izvedena korišćenjem TaqMan® microRNA Reverse Transcription kit-a prema protokolu proizvođača (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, SAD). Količina RNK koja je korišćena u reakciji bila je 100ng. Za reakciju reverzne transkripcije (RT) konstruisana je mešavina (engl. *pool*) prajmera, u kojoj se nalaze prajmeri za reverznu transkripciju iz TaqMan® eseja za svaku miRNK čija je ekspresija merena: hsa-miR-185-5p (ID 002271), hsa-miR-484 (ID 001821) i RNU44 (ID 001094). Finalno razblaženje svakog prajmera je 0,05x. Sintetisana cDNK je skladištena na -20°C. Sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije reverzne transkripcije miRNK su prikazani u Tabeli M3.

Tabela M2. Sastav reakcione smeše i temperaturni uslovi za reverznu transkripciju RNK sa poliA repom korišćenjem RevertAid First strand cDNA synthesis kit-a

Sastav i volumen smeše	Teperaturni uslovi
1µL Oligo (dT)18 prajmera	
4µL 5X Reaction pufera	
0,5µL RiboLock RNase inhibitora (20U/µL)	42°C/60min
2µL 10mM dNTP Mix	70°C/10min
1µL RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze (200U/µL)	
0,5µL vode bez Rnaza	
11µL smeše DNK digestije	

Tabela M3. Sastav reakcione smeše i temperaturni uslovi za reverznu transkripciju miRNK korišćenjem TaqMan® microRNA Reverse Transcription kit-a

Sastav i volumen smeše	Teperaturni uslovi
6µl Mešavine prajmera	
1,5µl 10x RT pufera	16°C/30min
0,19µl Rnase inhibitora (20U/µl)	42°C/30min
0,3µL 100mM dNTP Mix	85°C/5min
3µl MultiScribe reverzne transkriptaze	4°C/∞
100ng RNK	

3.12. Relativna kvantifikacija ekspresije miRNK i iRNK ciljnih gena

Nivoi ekspresije miRNK i iRNK odabranih ciljnih gena određeni su kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu na ABI 7500 Fast Real Time PCR sistemu (Applied Biosystems, Inc., Foster Citi, SAD) korišćenjem TaqMan® ekspresionih eseja. Ovaj esej sastoji se od para neobebeženih PCR prajmera i TaqMan® probe obeležene fluorescentnom bojom koja je komplementarna delu sekvence koja se umnožava. Na svom 5' kraju TaqMan® proba je obeležena bojom tj. reporterom, dok se na 3' kraju nalazi utišavač. Kada se tokom amplifikacije proba nađe na putu Taq polimeraze biva degradovana njenom 5' egzonukleaznom aktivnošću, nakon čega utišavač prestaje da apsorbuje signal reportera i dolazi do emisije signala. Na taj način se signal detektuje samo pri specifičnom umnožavanju. U početnim ciklusima PCR reakcije signal se ne može detektovati, čime se definiše osnovni nivo signala amplifikacione krive. Tačka u kojoj intenzitet signala PCR reakcije doseže intenzitet fluorescentnog signala iznad baznog nivoa označen je kao prag (engl. *threshold*) signala i definisan je parametrom Ct.

Za relativnu kvantifikaciju nivoa iRNK ciljnih gena korišćeni su sledeći TaqMan® ekspresioni eseji: Hs00947377_m1 za *PKD1* (engl. *Polycystin-1*), Hs00540450_s1 za *MDM2* (engl. *Mouse double minute 2 homolog*), Hs00211420_m1 za *FIS1* (engl. *Mitochondrial Fission 1 Protein*), Hs01128537_m1 za *NOTCH3* (engl. *Neurogenic locus notch homolog 3*), Hs00559441_m1 za *APAF1* (engl. *Apoptosis protease-activating factor-1*), Hs00232586_m1 za *ATF6* (engl. *Activating transcription factor 6*), Hs00918044_g1 za *CDC42* (engl. *Cell division cycle 42*) i Hs00357608_m1 za *RHOA* (engl. *Ras homolog family member A*). Nivoi ekspresije izučavanih miRNK određeni su korišćenjem TaqMan mikro RNK ekspresionih eseja: ID 001821 za hsa-miR-484 i ID 002271 za hsa-miR-185-5p. Relativni nivoi iRNK i miRNK su normalizovani korišćenjem stabilno eksprimiranih endogenih kontrola, *GAPDH* (engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Hs02786624_g1) i RNU44 (001094). U Tabeli M4 prikazani su sastav smeše i uslovi za kvantifikaciju nivoa iRNK, dok su u Tabeli M5 prikazani sastav smeše i uslovi za kvantifikaciju nivoa miRNK.

Razlika u relativnom nivou miRNK ili iRNK ciljnog gena između grupa uzoraka predstavljena je kao stepen promene (engl. *Fold Change* – FC), koji pokazuje koliko je puta nivo miRNK ili iRNK viši/niši u ciljnoj grupi u poređenju sa referentnom grupom uzoraka.

Tabela M4. Sastav reakcione smeše i temperaturni uslovi za relativnu kvantifikaciju ekspresije iRNK ciljnih gena

Sastav i volumen smeše	Teperaturni uslovi	
6,25µL TaqMan™ Universal PCR Master Mix	50°C/2min	1 ciklus
0,625µL TaqMan® ekspresioni esej	95°C/10min	1 ciklus
4,625µL vode bez Rnaza	95°C/15s	40 ciklusa
	60°C/1min	

Tabela M5. Sastav reakcione smeše i temperaturni uslovi za relativnu kvantifikaciju ekspresije miRNK

Sastav i volumen smese	Teperaturni uslovi	
6,25µL TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG	95°C/10min	1 ciklus
0,625µL TaqMan® ekspresioni esej	95°C/15s	40 ciklusa
4,625µL vode bez Rnaza	60°C/1min	

3.13. Analiza relativnih nivoa miRNK i iRNK

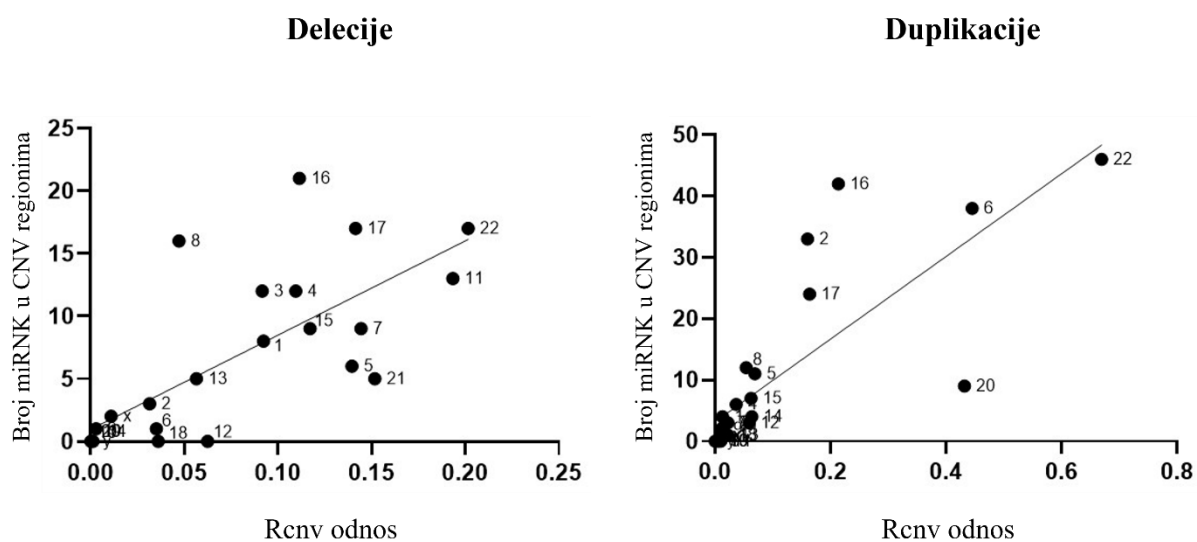
Relativna ekspresija ciljnih gena je dobijena pomoću $2^{-\Delta Ct}$ metode (Livak i sar., 2001). Analiza razlike u relativnim nivoima iRNK i miRNK između grupa je urađena korišćenjem Studentovog t testa. Smatralo se da vrednosti $p < 0,05$ ukazuju na značajnu razliku između ispitivanih grupa. Sve statističke analize i grafički prikaz rezultata obavljeni su korišćenjem softvera Prism v8 (GraphPad Software, Inc.).

4. Rezultati

4.1. Procena opterećenja gena koji kodiraju miRNK, retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

Za procenu opterećenja gena koji kodiraju miRNK, retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om bile su uključene sve ključne studije u kojima su istraživani retki CNV regioni u CAKUT-u (Sanna-Cherchi i sar., 2012; Westland i sar., 2015; Verbitsky i sar., 2015; Caruana i sar., 2015; Verbitsky i sar., 2019; Cai i sar., 2020). Inicijalno je izvršeno izračunavanje udela dužina svih poznatih prekursorskih miRNK sekvenci u odnosu na dužine odgovarajućeg hromozoma. Udeo dužine miRNK prekursora u odnosu na dužinu hromozoma (R_{mir} odnos) bio je relativno konstantan, reda veličine 10^{-5} za sve hromozome osim za hromozome 17 i 19, gde je odnos bio reda veličine 10^{-4} (Tabela R1), što ukazuje na ravnomernu raspoređenost gena za miRNK po hromozomima. Iako se broj identifikovanih miRNK povećao od trenutka kada je ovaj parameter inicijalno procenjen (Marrale i sar., 2014), udeo dužine gena za miRNK u odnosu na dužine hromozoma i dalje ostaje veoma sličan. Sa druge strane, frakciona dužina retkih CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om u odnosu na dužinu hromozoma (R_{cnv} odnos), koja je procenjena nezavisno za delecije i duplikacije (Tabela R1), značajno se razlikuje među hromozomima, od vrednosti 0,0012 (hromozom 9; delecija) do vrednosti 0,6691 (hromozom 22; duplikacija). Pored toga, nakon izvršenog mapiranja miRNK sekvenci na kumulativnu dužinu svih retkih CNV regiona, broj jedinstvenih prekursora miRNK koje su lokalizovane u ovim CNV regionima je takođe varirao u različitim hromozomima. Zbog toga je izvršena korelaciona analiza između broja jedinstvenih gena za miRNK koji se preklapaju sa retkim CNV regionima i R_{cnv} odnosa kako bi ispitali da li broj gena za miRNK prati linearni trend kao funkciju kumulativne dužine retkih CNV regiona (Slika R1).

Dobijene vrednosti koeficijenata korelacije između broja gena za miRNK koji se preklapaju sa retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i R_{cnv} odnosa su ukazale na statistički značajnu pozitivnu korelaciju kako u slučaju delecija tako i u slučaju duplikacija ($p < 0,0001$, Spirmanov test korelacije). Vrednosti koeficijenta korelacije su bile ($r=0,8885$, $95\%CI=0,7505-0,9522$) za retke duplikacije i ($r=0,8498$, $95\%CI=0,6724-0,9349$) za retke delecije. Retke duplikacije su pronađene na svim hromozomima osim na hromozomu Y kod pacijenata sa CAKUT-om, dok retke delecije nisu identifikovane na hromozomima 14, 19, 20 i Y. Određeni hromozomi ne prate linearni trend i karakteriše ih relativno veliki ili relativno mali broj gena za miRNK koji su lokalizovani u retkim CNV regionima koji su povezani sa CAKUT-om (Tabela R1, Slika R1). Na primer, hromozom 16 se može smatrati pomenutim izuzetkom, budući da je u retkim delecijama i duplikacijama koje su u CAKUT-u identifikovane na ovom hromozomu, lociran relativno veliki broj gena za miRNK. Suprotno tome, na hromozomima 21 i 20 je lociran relativno manji broj gena za miRNK u retkim delecijama i duplikacijama koje su u CAKUT-u identifikovane na ovim hromozomima.



Slika R1. Grafik korelacije između broja gena za miRNK koje su lokalizovane u retkim CNV regionima i frakcije dužine CNV regiona (odnos Rcnv) za delecije i duplikacije. Brojevi pored krugova predstavljaju brojeve hromozoma. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2022.

Tabela R1. Dužina prekursorskih miRNK sekvenci i retkih CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om u odnosu na dužinu hromozoma.

#	Hromozom		Duplikacije		Delecije		
	Dužina (bp)	# miRNK	Rmir odnos	Rcnv odnos	# miRNK	Rcnv odnos	# miRNK
1	249250621	161	5,22E-05	0,0133	4	0,0865	7
2	243199373	113	3,73E-05	0,1623	33	0,0341	3
3	198022430	93	3,84E-05	0,0113	0	0,1045	13
4	191154276	61	2,65E-05	0,0408	6	0,1116	12
5	180915260	73	3,38E-05	0,0693	11	0,1395	6
6	171115067	67	3,21E-05	0,0086	1	0,0351	1
7	159138663	78	4,22E-05	0,0174	3	0,1473	9
8	146364022	91	5,01E-05	0,0282	6	0,0471	16
9	141213431	84	4,91E-05	0,0240	11	0,0012	0
10	135534747	70	4,30E-05	0,0045	0	0,0049	1
11	135006516	102	6,02E-05	0,0101	0	0,1934	13
12	133851895	76	4,83E-05	0,0589	3	0,0677	1
13	115169878	40	2,85E-05	0,0254	1	0,0591	5
14	107349540	98	7,43E-05	0,0637	4	N/A	N/A
15	102531392	67	5,56E-05	0,0952	10	0,1171	9
16	90354753	76	6,71E-05	0,2044	34	0,2170	29
17	81195210	108	0,0001077	0,1639	24	0,1415	17
18	78077248	35	3,40E-05	0,0193	1	0,0361	0
19	59128983	142	0,0001941	0,0037	0	N/A	N/A
20	63025520	47	5,95E-05	0,4317	9	N/A	N/A
21	48129895	22	3,84E-05	0,0224	3	0,1518	5
22	51304566	46	7,15E-05	0,6691	46	0,2016	17
X	155270560	118	6,46E-05	0,0101	1	0,0126	2
Y	59373566	2	2,34E-06	N/A	N/A	N/A	N/A

Rmir odnos – odnos između zbira dužina svih sekvenci prekursora miRNK na hromozomu i ukupne dužine hromozoma; Rcnv odnos – odnos između zbira dužina svih retkih CNV regiona na hromozomu i ukupne dužine hromozoma; # miRNK – za svaki hromozom, ukupan broj jedinstvenih prekursorskih miRNK sekvenci lokalizovanih u svim retkim CNV regionima koji su detektovani kod pacijenata sa CAKUT-om; N/A – (engl. *not applicable*). Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2022.

4.2. Identifikacija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

Nakon što je generisana baza podataka o patogenim i uslovno patogenim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om (Verbitsky i sar., 2019), izvršeno je mapiranje sekvenci miRNK na ove regione. Za razliku od baze podataka koja je korišćena za procenu opterećenja gena za miRNK retkim CNV regionima, baza koja je korišćena za identifikaciju miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima je obuhvatala 153 pacijenta sa CAKUT-om čiji su fenotipovi prikazani u Tabeli R2. Veličina retkih CNV regiona se kretala od 0,01Mbp do 34,11Mbp. Aneuploidije, iako su prijavljene za X hromozom u CAKUT-u, nisu uključene u dalju analizu jer se smatralo da su neinformativne u kontekstu funkcionalne interpretacije, dok su retki CNV regioni koji ne obuhvataju ceo X hromozom zadržani. Nakon mapiranja miRNK sekvenci, identifikovano je da u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om mapira 316 gena koji kodiraju miRNK.

Uklanjanje sufiksa iz anotacije identifikovanih miRNK ukazalo je da one oslikavaju 276 jedinstvenih miRNK i miRNK familija. Retki CNV regioni identifikovani kod 31 pacijenta sa CAKUT-om nisu sadržali gene koji kodiraju miRNK. U cilju dalje bioinformatičke i funkcionalne interpretacije, zadržano je prvih deset miRNK i familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om (Tabela R3).

Analiza familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima kod pacijenata sa CAKUT-om je ukazala na obogaćenje familije miR-548 (Tabela R3). Pošto nijedan član familije miR-548 nije bio među prvih deset miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om (Tabela R3), upoređeni su rezultati sa uticajem polimorfni CNV regiona na članove familije miR-548 u kontrolama, koristeći podatke preuzete iz baze podataka kontrola gnomAD SV. Od čak 73 prekursora familije miR-548 koji su locirani na skoro svim hromozomima, samo je jedan prekursor (hsa-mir-548i-3) mapiran u polimorfnom CNV regionu kod kontrola. Ovo podržava rezultate da članovi familije miR-548 pokazuju obogaćenje u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Još jedna obogaćena familija miRNK bila je miR-378, identifikovana u retkim CNV regionima 30 pacijenata (Tabela R3). hsa-mir-378j je bila dominantni član ove familije u pogledu uticaja retkog CNV regiona, koja je prethodno takođe identifikovana kao jedna od miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, pre uklanjanja anotacionog sufiksa (Tabela R3).

Tabela R2. Fenotipovi pacijenata kod kojih su identifikovani retki patogeni ili uslovno patogeni CNV regioni koji su uključeni u analizu identifikacije miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om.

Kategorije CAKUT-a	Fenotipovi	Broj pacijenata
Anomalije bubrega (AB)	Ageneza bubrega, bubrežna hipoplazija/displazija i multicistična displazija	99
Opstruktivne uropatije (OU)	Urođena hidronefroza, opstrukcije na uretero-pelvičnom spoju (UPS), opstrukcije na uretero-vezikularnom spoju (UVZ), opstruktivni megaureter (OMU)	17
Valvula zadnje uretre (VZU)	Valvula zadnje uretre	9
Vezikoureteralni refluks (VUR)	Vezikoureteralni refluks	19
Duplirani sabirni sistem (DSS)	Kompletne ili parcijalne duplikacije uretera i bubrega	9

Podaci preuzeti iz Verbitsky i sar., 2019.

Tabela R3. Deset miRNK i familija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om.

miRNK	N	Fenotipovi CAKUT-a				
		AB	OU	VZU	VUR	DSS
hsa-mir-378j	24	20	2	1	0	1
hsa-mir-2909	23	19	2	1	0	1
hsa-mir-649	17	13	1	1	1	1
hsa-mir-484	9	6	2	0	0	1
hsa-mir-6506	9	6	2	0	0	1
hsa-mir-5087	8	5	1	1	1	0
hsa-mir-1306	8	5	0	1	1	1
hsa-mir-3680-2	7	3	1	2	1	0
hsa-mir-185	7	5	0	1	0	1
hsa-mir-3618	7	5	0	1	0	1
Familije miRNK						
hsa-mir-378	30	26	2	1	0	1
hsa-mir-2909	23	19	2	1	0	1
hsa-mir-649	17	13	1	1	1	1
hsa-mir-548	13	11	0	0	1	1
hsa-mir-484	9	6	2	0	0	1
hsa-mir-6506	9	6	2	0	0	1
hsa-mir-1306	8	5	0	1	1	1
hsa-mir-5087	8	5	1	1	1	0
hsa-mir-185	7	5	0	1	0	1
hsa-mir-3180	7	4	2	0	0	1

N – broj pacijenata koji imaju redak CNV region koji sadrži specifičnu miRNK ili familiju miRNK. CAKUT kategorije: AB – anomalije bubrega, OU – opstruktivne uropatije, VZU – valvula zadnje uretre, VUR – vezikoureteralni refluks, DSS – duplirani sabirni sistem. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2022.

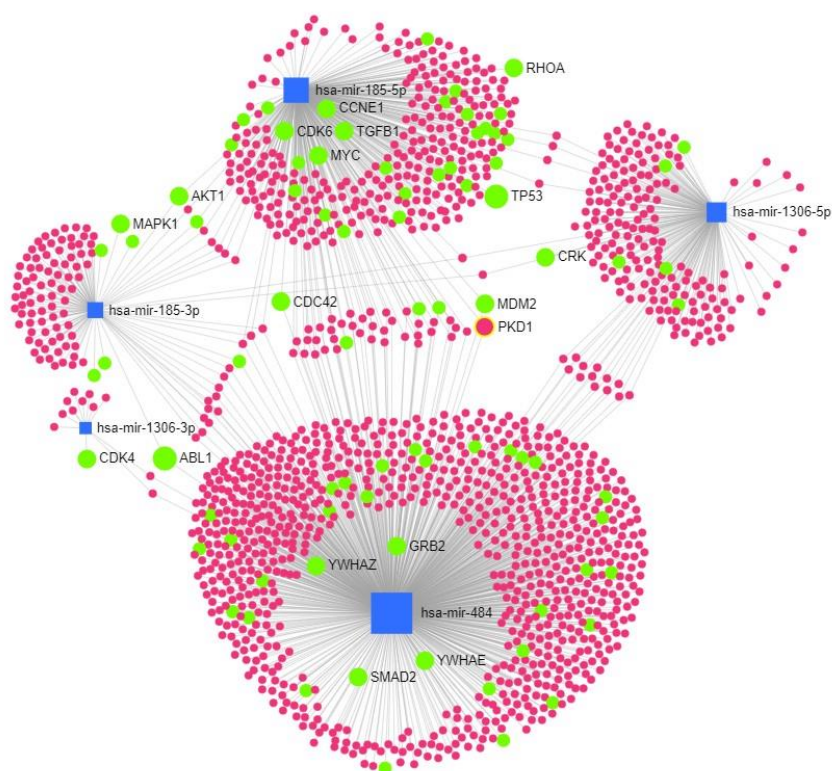
4.3. Bioinformatička analiza miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

U cilju biološke interpretacije miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, konstruisana je mreža interakcija miRNK i njihovih ciljnih gena (Slika R2). Od deset miRNK koje su korišćene kao ulazni podatak za kreiranje mreže (Tabela R3), samo su 3 zadržane od strane algoritma mreže koji dozvoljava samo interakcije u tkivu bubrega (hsa-miR-484, hsa-miR-185 i hsa-miR-1306). Algoritam je automatski prepoznao zrele forme miRNK i njihove specifične interakcije. Dva glavna modula interakcija karakterišu generisanu mrežu i grupišu se oko hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p. Pored toga što ove dve miRNK imaju najveći broj interakcija sa ciljnim genima u mreži, uočen je i relativno veliki broj zajedničkih ciljnih gena. Za dalju funkcionalnu studiju, hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p su odabrane kao miRNK kandidati.

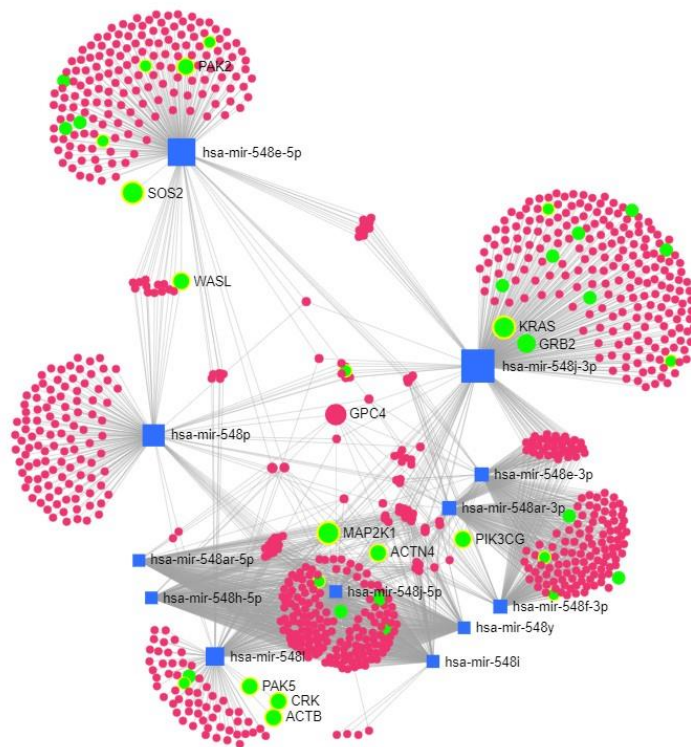
Zbog uočenog obogaćenja familije miR-548 među najčešće lokalizovanim familijama u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om (Tabela R3), dodatno je generisana mreža

interakcija miRNK i ciljnih gena članova ove familije koji su lokalizovani u retkim CNV regionima (hsa-mir-548ar, hsa-mir-548e, hsa-mir-548f-2, hsa-mir-548f-3, hsa-mir-548f-4, hsa-mir-548h-2, hsa-mir-548i-1, hsa-mir-548i-2, hsa-mir-548j, hsa-mir-548l, hsa-mir-548p, hsa-mir-548i). Pošto je u ovom slučaju cilj bio da se funkcionalno okarakterišu miRNK iz jedne familije, nije korišćen filter za interakcije u tkivu bubrega. Algoritam je automatski prepoznao zrele forme miRNK, uključujući 12 miRNK čvorova u mreži (Slika R3). Analiza centralnosti je ukazala na *GPC4* kao gen koji je regulisan najvećim brojem miRNK iz familije miR-548.

Analizom obogaćenja ciljnih gena miRNK koje su zadržane od strane algoritma mreže i ciljnih gena članova familije miR-548 lokalizovanih u CNV regionima kod pacijenata sa CAKUT-om (Slike R2 i R3) identifikovani su značajni molekularni KEGG putevi kojima ti ciljni geni pripadaju (Tabela R4).



Slika R2. Mreža interakcija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena. Kvadrati predstavljaju miRNK dok krugovi predstavljaju gene regulisane od strane tih miRNK. Veličina kvadrata i krugova prikazuje broj interakcija miRNK i ciljnih gena na osnovu podataka iz miRTarBase v8.0 baze podataka. Zelenom bojom su markirani geni uključeni u značajno obogaćene puteve, pri čemu je veličina kruga proporcionalna broju značajno obogaćenih puteva u kojima specifični gen učestvuje. Slika objavljena u Mitrović i sar., 2022.



Slika R3. Mreža interakcija miRNK, članova familije miR-548 koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena. Kvadrati predstavljaju miRNK dok krugovi predstavljaju gene regulisane od strane tih miRNK. Veličina kvadrata i krugova prikazuje broj interakcija miRNK i ciljnih gena na osnovu podataka iz miRTarBase v8.0 baze podataka. Zelenom bojom su markirani geni uključeni u značajno obogaćene puteve, pri čemu je veličina kruga proporcionalna broju značajno obogaćenih puteva u kojima specifični gen učestvuje. Slika objavljena u Mitrović i sar., 2022.

Tabela R4. Molekularni putevi obogaćeni u ciljnim genima miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i članova familije miR-548.

	Broj gena u putu	Broj gena u mreži	p vrednost*	Korigovana p vrednost [#]
Obogaćeni putevi ciljnih gena miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om				
Ćelijski ciklus	124	23	0,000227	0,0227
Put kvaliteta kontrole iRNK	82	16	0,00116	0,03275
Putevi u kancerogenezi	310	42	0,0012	0,03275
Signalni put neurotrofina	123	21	0,00131	0,03275
Obogaćeni putevi ciljnih gena članova miR-548 familije				
Erb-B signalni put	87	14	0,000107	0,0098
Formiranje dorzo-ventralne ose	12	5	0,000196	0,0098
Međucelijske veze	70	11	0,000727	0,02135
Regulacija aktinskog citoskeleta	182	20	0,000854	0,02135

* – hipergeometrijski test; # – Korigovana p vrednost na višestruko testiranje. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2022.

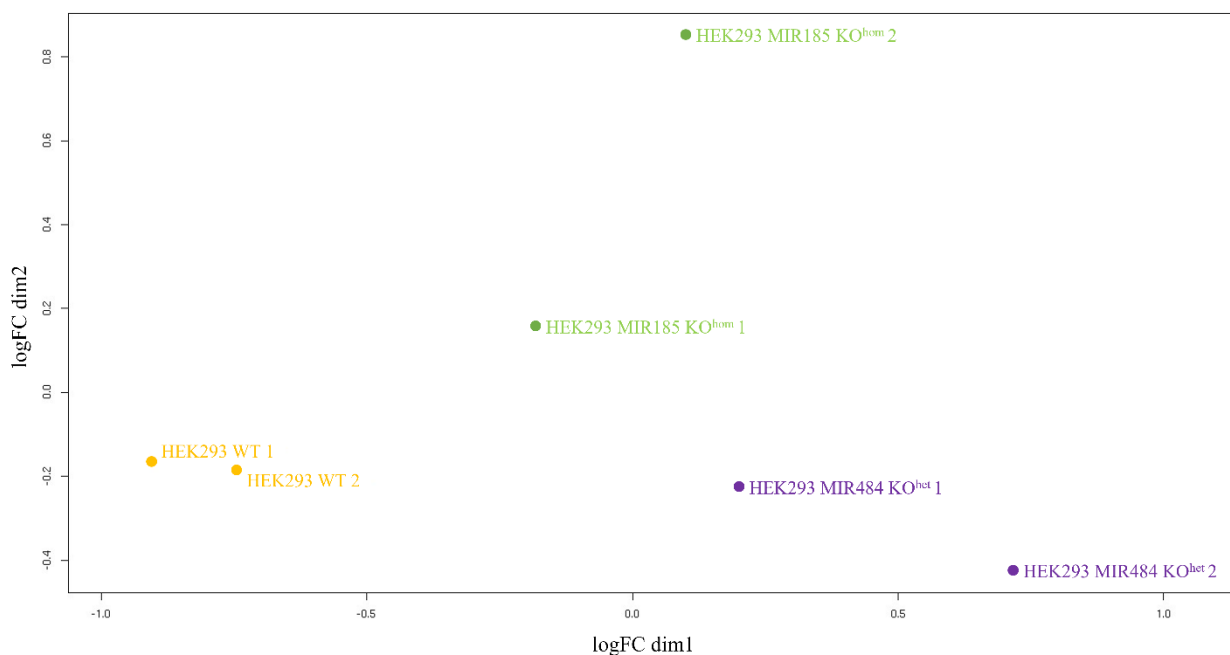
4.4. Analiza miRNoma primenom metode sekvenciranja nove generacije

U ovoj studiji, upotrebom NGS tehnologije analizirane su sve tri ćelijske linije (HEK293 WT, HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 MIR185 KO^{hom}), kako bi se utvrdile razlike u nivou najviše eksprimiranih miRNK. Kontrolom kvaliteta je utvrđeno da su rezultati sekvenciranja uniformni, u skladu sa propozicijama SMARTer™ metode i da ne postoji kontaminacija.

Nakon obrade i poravnanja *read*-ova, u analiziranim uzorcima je detektovano između 95 i 126 različitih miRNK. Korišćenjem dijagrama za multidimenziono skaliranje (MDS dijagram) na podacima iz DeSeq2 algoritma, utvrđeno je jasno razdvajanje između grupa ćelijskih linija (Slika R4).

Na osnovu definisanog uslova da bar dva od 4 upotrebljena algoritma identifikuju diferencijalnu ekspresiju iste miRNK između ispitivanih grupa identifikovan je značajno viši nivo hsa-miR-130a-3p u HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijskim linijama u odnosu na HEK293 WT (Tabela R5) i značajno viši nivo hsa-miR-1246 u HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijskim linijama u odnosu na HEK293 WT (Tabela R6).

hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p nisu identifikovane kao diferencijalno eksprimirane miRNK između nokaut ćelijskih linija i HEK293 WT ćelijske linije. Razlog je što ove dve miRNK ne pripadaju grupi najviše eksprimiranih miRNK i za njihovu detekciju neophodna je veća dubina čitanja. Podaci koji su generisani u ovom eksperimentu su deponovani u javnoj bazi podataka pod identifikacionim brojem E-MTAB-13009.



Slika R4. Projekcija sekvenciranih uzoraka na MDS dijagramu. Distanca između uzoraka ukazuje na veću ili manju razliku u profilu ekspresije identifikovanih miRNK.

Tabela R5. Diferencijalno eksprimirane miRNK između HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 WT ćelijskih linija, identifikovane na osnovu konsenzusa algoritama.

miRNK	DeSeq2 algoritam		edgeR algoritam		NOISeq algoritam		DESeq	
	log2 FC	Korigovana p vrednost#	log2 FC	Korigovana p vrednost#	log2 FC	Korigovana p vrednost#	log2 FC	Korigovana p vrednost#
hsa-miR-130a-3p	3,94	<0,01	3,62	0,02	3,77	0,04	N/A	ns

FC – pokazuje koliko je puta nivo miRNK viši/niši u ciljnoj grupi u odnosu na referentnu grupu uzoraka; # – Korigovana p vrednost na višestruko testiranje; N/A – (engl. *not applicable*); ns – (engl. *nonsignificant*).

Tabela R6. Diferencijalno eksprimirane miRNK između HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT ćelijskih linija, identifikovane na osnovu konsenzusa algoritama.

miRNK	DeSeq2 algoritam		edgeR algoritam		NOISeq algoritam		DESeq	
	log2 FC	Korigovana p vrednost#	log2 FC	Korigovana p vrednost#	log2 FC	Korigovana p vrednost#	log2 FC	Korigovana p vrednost#
hsa-miR-1246	2,2	<0,01	1,84	0,04	N/A	NS	N/A	ns

FC – pokazuje koliko je puta nivo miRNK viši/niši u ciljnoj grupi u odnosu na referentnu grupu uzoraka; # – Korigovana p vrednost na višestruko testiranje; N/A – (engl. *not applicable*); ns – (engl. *nonsignificant*).

4.5. Kvantifikacija ekspresije miRNK kandidata i iRNK ciljnih gena

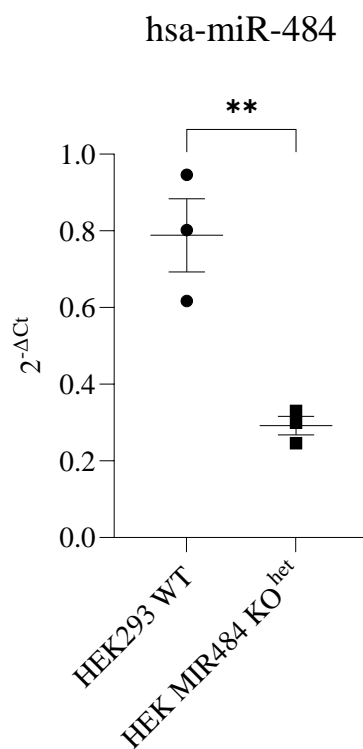
Funkcionalna studija je urađena kako bi se potvrdio efekat retkog CNV regiona na ekspresiju miRNK, a posleđično i na nivoe njenih ciljnih gena.

Na osnovu analize topologije mreže kuplovano sa analizom obogaćenja ciljnih gena i istraživanjem literature, odabrani su ciljni geni kandidati sa potencijalnom ulogom u CAKUT-u. Dva gena, *MDM2* i *PKD1*, su odabrana kao ciljni geni i hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p (Slika R2). Za obe miRNK su odabrana jos tri dodatna gena (kao ciljni geni kandidati za hsa-miR-484 odabrani su *FIS1*, *APAF1* i *NOTCH3*, dok su kao ciljni geni kandidati hsa-miR-185-5p odabrani *CDC42*, *RHOA* i *ATF6*).

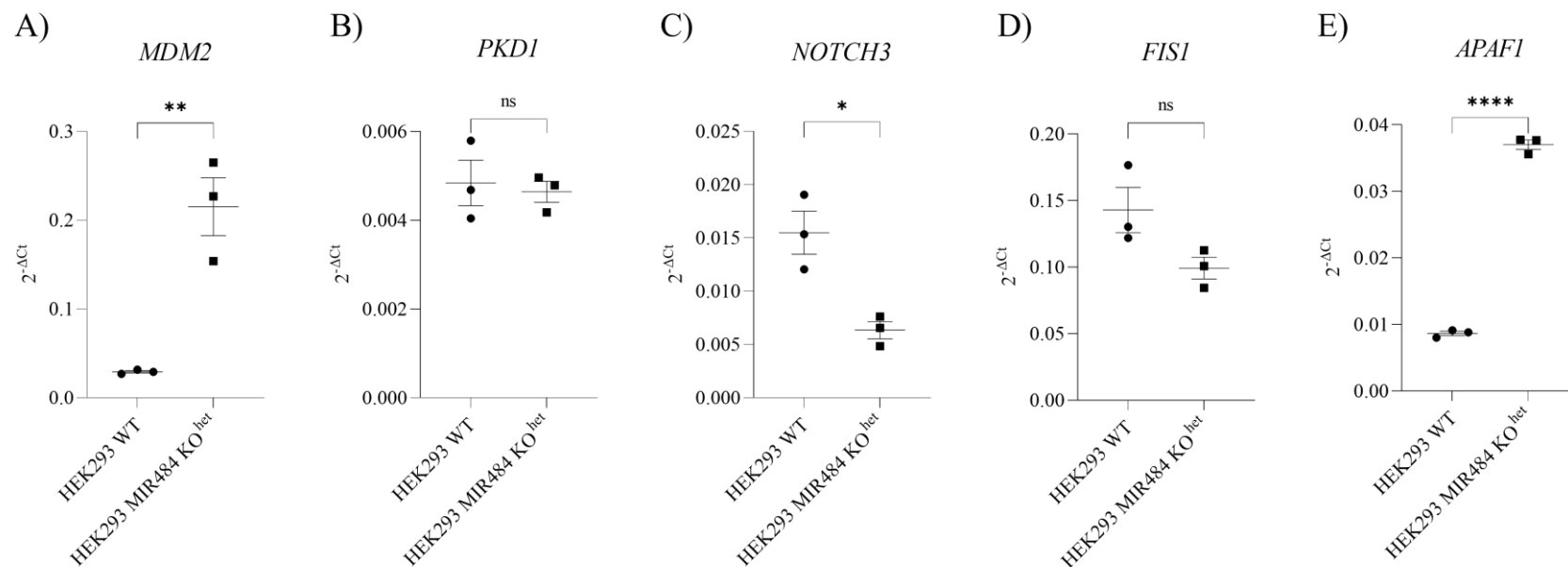
4.5.1. Relativna kvantifikacija ekspresije hsa-miR-484, hsa-miR-185-5p i iRNK ciljnih gena u nokaut ćelijskim linijama i HEK293 WT

Identifikovan je značajno niži nivo hsa-miR-484 u HEK293 MIR484 KO^{het} u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom (FC=0,37; Studentov t test, p=0,007) (Slika R5). Ispitivanjem nivoa iRNK ciljnih gena kandidata za hsa-miR-484 uočeno je značajno povećanje nivoa iRNK gena *MDM2* (FC=7,36; Studentov t test, p_{MDM2}=0,005) i *APAF1* (FC=4,28; Studentov t test, p_{APAF1}<0.0001) i smanjenje nivoa iRNK gena *NOTCH3* (FC=0,41; Studentov t test, p_{NOTCH3}=0,014) u HEK293 MIR484 KO^{het} u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom (Slika R6). Nivo iRNK *FIS1* i *PKD1* se nije razlikovao između HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 WT ćelijskih linija (Studentov t test, p_{FIS1}=0,081 i p_{PKD1}=0,742) (Slika R6).

Ekspresija hsa-miR-185-5p nije detektovana u HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijskoj liniji u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom gde je ekspresija ove miRNK identifikovana (FC=0,006; Studentov t test, p=0,0045) (Slika R7). Ispitivanjem nivoa iRNK ciljnih gena kandidata za hsa-miR-185-5p uočeno je povećanje nivoa iRNK *MDM2* (FC=12,77; Studentov t test, p_{MDM2}=0,0004) i smanjenje nivoa iRNK *RHOA* (FC=0,62; Studentov t test, p_{RHOA}=0,0008) u HEK293 MIR185 KO^{hom} u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom (Slika R8). Sa druge strane, nivo iRNK *ATF6*, *CDC42* i *PKD1* se nije razlikovao između HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT ćelijskih linija (Studentov t test, p_{ATF6}=0,344, p_{CDC42}=0,063 i p_{PKD1}=0,494) (Slika R8).

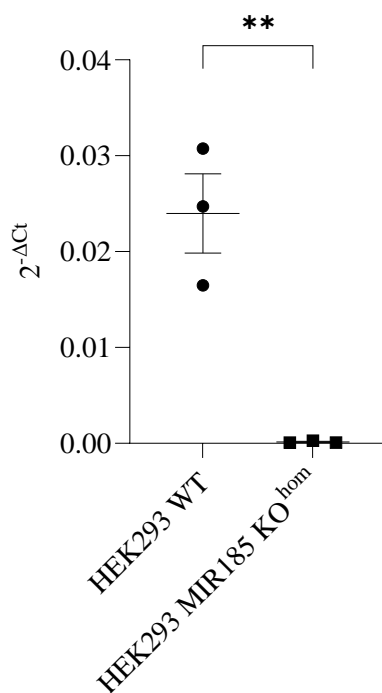


Slika R5. Relativna kvantifikacija ekspresije hsa-miR-484 u ćelijskim linijama HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 WT. Na dijagramu su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *RNU44* korišćen je za normalizaciju rezultata, p vrednost je određena pomoću Studentovog t testa, $p=0,007$. ** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,01$. Grafik objavljen u Mitrović i sar., 2022.

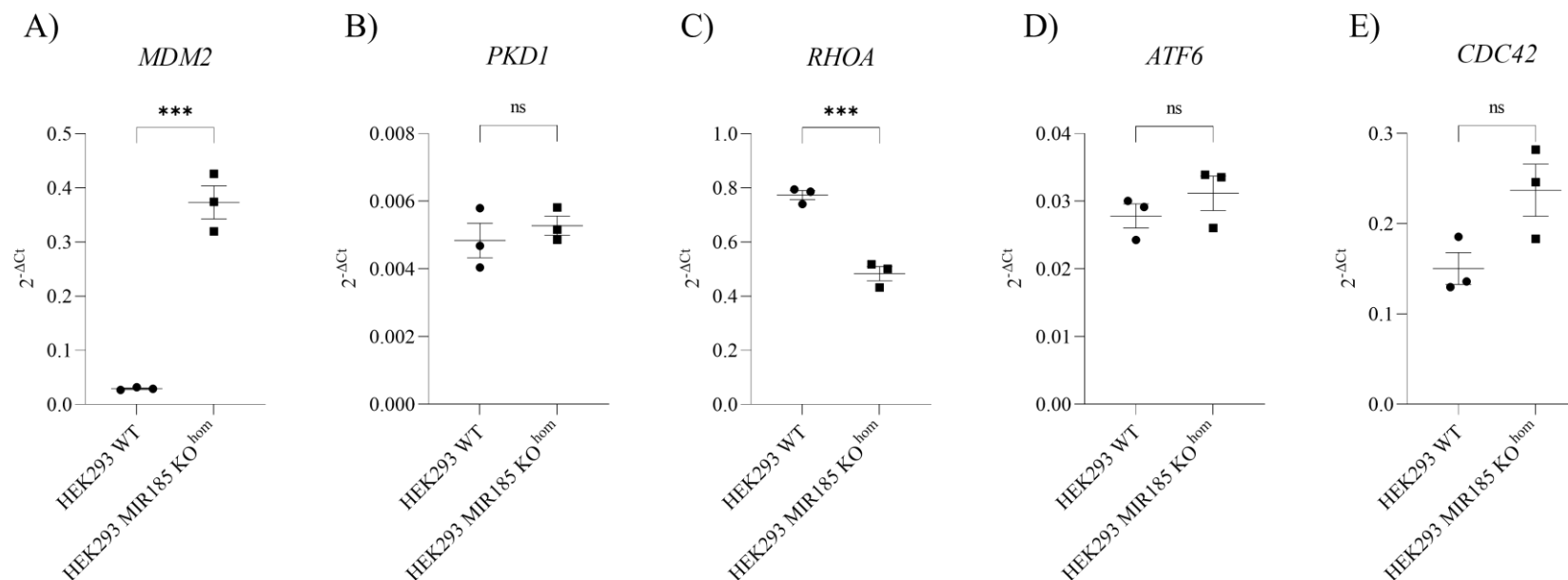


Slika R6. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-484 u HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 WT ćelijskoj liniji. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *GAPDH* korišćen je za normalizaciju rezultata. A) Relativna ekspresija *MDM2*, Studentov t test, $p_{MDM2}=0,005$ B) Relativna ekspresija *PKD1*, Studentov t test, $p_{PKD1}=0,742$ C) Relativna ekspresija *NOTCH3*, Studentov t test, $p_{NOTCH3}=0,014$ D) Relativna ekspresija *FIS1*, Studentov t test, $p_{FIS1}=0,081$ E) Relativna ekspresija *APAF1*, Studentov t test, $p_{APAF1}< 0,0001$. * – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,05$; ** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,01$; **** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,0001$; ns – ne postoji značajna razlika između ispitivanih grupa. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2022.

hsa-miR-185-5p



Slika R7. Relativna kvantifikacija ekspresije hsa-miR-185-5p u ćelijskim linijama HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT. Na dijagramu su prikazane srednje vrednosti 2^{-ΔCt} sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *RNU44* korišćen je za normalizaciju rezultata, p vrednost je određena pomoću Studentovog t testa, p=0,0045. ** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri p<0,01. Grafik objavljen u Mitrović i sar., 2024.



Slika R8. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-185-5p u HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT ćelijskoj liniji. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *GAPDH* korišćen je za normalizaciju rezultata. A) Relativna ekspresija *MDM2*, Studentov t test, $p_{MDM2}=0,0004$ B) Relativna ekspresija *PKD1*, Studentov t test, $p_{PKD1}=0,494$ C) Relativna ekspresija *RHOA*, Studentov t test, $p_{RHOA}=0,0008$ D) Relativna ekspresija *ATF6*, Studentov t test, $p_{ATF6}=0,344$ E) Relativna ekspresija *CDC42*, Studentov t test, $p_{CDC42}=0,063$. *** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p < 0,001$; ns – ne postoji značajna razlika između ispitivanih grupa. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2024.

4.5.2. Relativna kvantifikacija ekspresije hsa-miR-484, hsa-miR-185-5p i iRNK ciljnih gena nakon tretmana ćelijskih linija odgovarajućim miRNK mimikama

Kako bi potvrdili uspešnu proceduru transfekcije, ćelijske linije (HEK293 MIR484 KO^{het}, HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT) su tretirane miRNK mimikom čiji je ciljni gen *GAPDH* (pozitivna kontrola). Primetnim povećanjem Ct vrednosti *GAPDH* u ćelijama koje su tretirane pozitivnom kontrolom u poređenju sa ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom, za koju je poznato da ne utiče na ekspresiju gena u humanim ćelijama potvrđena je uspešnost transfekcije (Tabela R7).

Uspešna transfekcija hsa-miR-185-5p mimike u ćelijske linije HEK293 MIR185 KO^{hom} (Tabela R8) i HEK293 WT (Tabela R9), kao i transfekcija hsa-miR-484 mimike u HEK293 MIR484 KO^{het} (Tabela R10) i HEK293 WT (Tabela R11) su potvrđene razlikom u ekspresiji u ćelijama koje su tretirane mimikama u odnosu na ćelije tretirane NT miRNK kontrolom. Za normalizaciju rezultata korišćena je endogena kontrola RNU44, koja je u svim ćelijskim linijama bila stabilno eksprimirana.

Tabela R7. Ct vrednosti za *GAPDH* nakon tretmana ćelijskih linija (HEK293 MIR484 KO^{het}, HEK293 MIR185 KO^{hom} i HEK293 WT), mimikom čiji je ciljni gen *GAPDH*

Tretman HEK293 MIR484 KO ^{het} ćelijske linije		Tretman HEK293 MIR185 KO ^{hom} ćelijske linije		Tretman HEK293 WT ćelijske linije	
NT miRNK kontrola	Pozitivna kontrola	NT miRNK kontrola	Pozitivna kontrola	NT miRNK kontrola	Pozitivna kontrola
19,425	21,345	18,911	24,382	17,83	22,699
18,964	20,624	18,84	24,126	17,648	22,421
/	/	18,776	24,199	17,719	23,257

/ – Treći replikat nije uključen u studiju zbog odstupanja nastalih usled tehničkih razloga.

Tabela R8. Razlika u relativnoj ekspresiji RNU44 i hsa-miR-185-5p nakon tretmana HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijske linije mimikom hsa-miR-185-5p.

Uzorak	RNU44	hsa-miR-185-5p	$2^{-\Delta Ct}$
	Ct vrednosti		
NT miRNK kontrola 1	27,138	Nije detektovano	/
NT miRNK kontrola 2	26,115	37,861	0,000291
NT miRNK kontrola 3	26,411	Nije detektovano	/
hsa-miR-185-5p mimika 1	26,327	20,84	44,84888
hsa-miR-185-5p mimika 2	26,21	21,92	19,56224
hsa-miR-185-5p mimika 3	25,861	19,153	104,5464

Na osnovu ujednačenih Ct vrednosti endogene kontrole *RNU44* i detektovanih razlika u Ct vrednostima hsa-miR-185-5p u ćelijama HEK293 MIR185 KO^{hom} koje su tretirane hsa-miR-185-5p mimikom u odnosu na ćelije tretirane NT miRNK kontrolom, uspešna transfekcija hsa-miR -185-5p mimikom je potvrđena. Veća vrednost $2^{-\Delta Ct}$ odgovara većoj ekspresiji miRNK. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2024.

Tabela R9. Razlika u relativnoj ekspresiji RNU44 i hsa-miR-185-5p nakon tretmana HEK293 WT ćelijske linije mimikom hsa-miR-185-5p.

Uzorak	RNU44	hsa-miR-185-5p	$2^{-\Delta Ct}$
	Ct vrednosti		
NT miRNK kontrola 1	25,613	32,083	0,011281
NT miRNK kontrola 2	25,363	32,207	0,008705
NT miRNK kontrola 3	25,467	31,734	0,012985
hsa-miR-185-5p mimika 1	25,171	18,771	84,44851
hsa-miR-185-5p mimika 2	25,202	18,934	77,06479
hsa-miR-185-5p mimika 3	25,454	18,973	89,32549

Na osnovu ujednačenih Ct vrednosti endogene kontrole *RNU44* i detektovanih razlika u Ct vrednostima hsa-miR-185-5p u ćelijama HEK293 WT koje su tretirane hsa-miR-185-5p mimikom u odnosu na ćelije tretirane NT miRNK kontrolom, uspešna transfekcija hsa-miR-185-5p mimikom je potvrđena. Veća vrednost $2^{-\Delta Ct}$ odgovara većoj ekspresiji miRNK. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2024.

Tabela R10. Razlika u relativnoj ekspresiji RNU44 i hsa-miR-484 nakon tretmana HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijske linije mimikom hsa-miR-484.

Uzorak	RNU44	hsa-miR-484	$2^{-\Delta Ct}$
	Ct vrednosti		
NT miRNK kontrola 1	26,371	28,067	0,308641
NT miRNK kontrola 2	25,881	27,443	0,338681
NT miRNK kontrola 3	26,36	27,624	0,416388
hsa-miR-484 mimika 1	26,28	16,386	951,4605
hsa-miR-484 mimika 2	25,754	16,571	581,244
hsa-miR-484 mimika 3	25,915	16,862	531,159

Na osnovu ujednačenih Ct vrednosti endogene kontrole *RNU44* i detektovanih razlika u Ct vrednostima hsa-miR-484 u ćelijama HEK293 MIR484 KO^{het} koje su tretirane hsa-miR-484 mimikom u odnosu na ćelije tretirane NT miRNK kontrolom, uspešna transfekcija hsa-miR-484 mimikom je potvrđena. Veća vrednost $2^{-\Delta Ct}$ odgovara većoj ekspresiji miRNK. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2024.

Tabela R11. Razlika u relativnoj ekspresiji RNU44 i hsa-miR-484 nakon tretmana HEK293 WT ćelijske linije mimikom hsa-miR-484.

Uzorak	RNU44	hsa-miR-484	$2^{-\Delta Ct}$
	Ct vrednosti		
NT miRNK kontrola 1	25,613	25,308	1,235419
NT miRNK kontrola 2	25,363	25,158	1,152686
NT miRNK kontrola 3	25,467	24,934	1,446935
hsa-miR-484 mimika 1	25,484	15,458	1042,622
hsa-miR-484 mimika 2	25,337	15,037	1260,692
hsa-miR-484 mimika 3	25,669	15,194	1423,276

Na osnovu ujednačenih Ct vrednosti endogene kontrole *RNU44* i detektovanih razlika u Ct vrednostima hsa-miR-484 u ćelijama HEK293 WT koje su tretirane hsa-miR-484 mimikom u odnosu na ćelije tretirane NT miRNK kontrolom, uspešna transfekcija hsa-miR-484 mimikom je potvrđena. Veća vrednost $2^{-\Delta Ct}$ odgovara većoj ekspresiji miRNK. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2024.

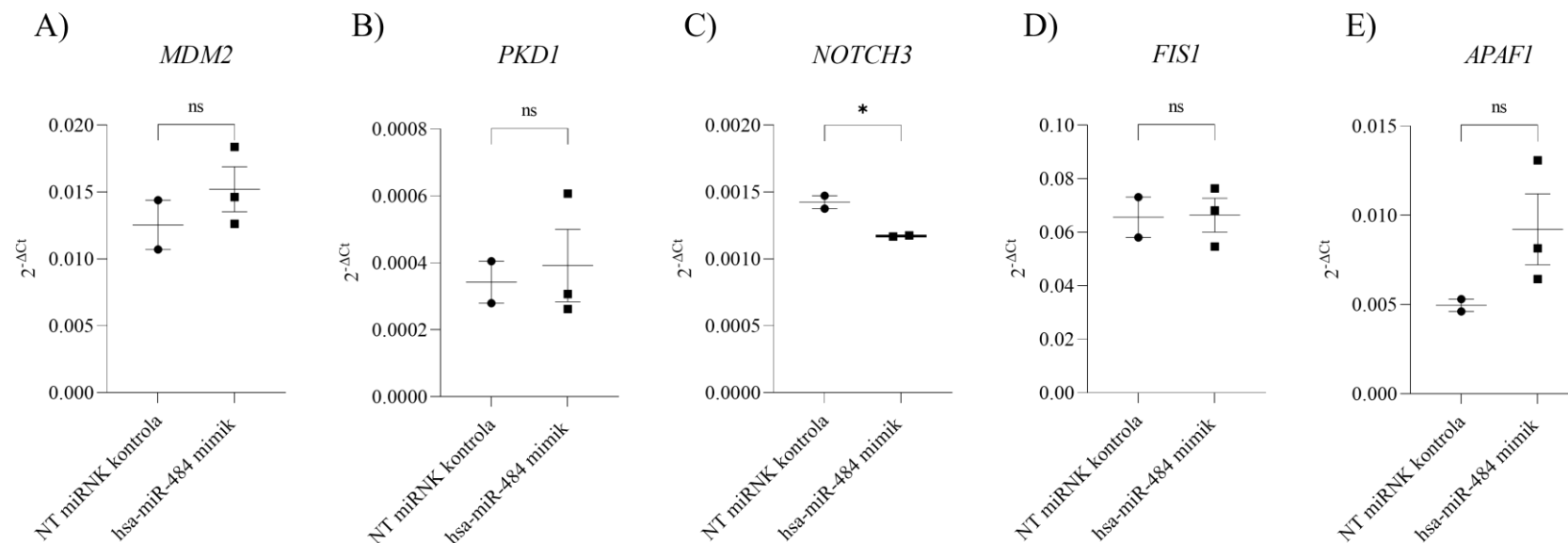
Identifikovano je smanjenje nivoa iRNK *NOTCH3* u HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijama koje su tretirane hsa-miR-484 mimikom u poređenju sa HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom (FC=0,82; Studentov t test, $p_{NOTCH3}=0,035$). Nisu detektovane značajne razlike u nivoima iRNK *MDM2*, *FISI*, *APAF1* i *PKD1* između HEK293 MIR484 KO^{het} ćelija koje su tretirane hsa-miR-484 mimikom i HEK293 MIR484 KO^{het} ćelija koje su tretirane NT miRNK kontrolom (Studentov t test, $p_{MDM2}=0,378$, $p_{FISI}=0,941$, $p_{APAF1}=0,198$ i $p_{PKD1}=0,759$) (Slika R9; Tabela R12).

Identifikovano je povećanje nivoa iRNK *ATF6* (FC=1,89; Studentov t test, $p_{ATF6}=0,008$) i povećanje nivoa iRNK *RHOA* (FC=1,39; Studentov t test, $p_{RHOA}=0,03$) u HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijama koje su tretirane hsa-miR-185-5p mimikom u poređenju sa HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom. Nisu detektovane značajne razlike u nivoima iRNK *CDC42*, *MDM2* i *PKD1* između HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelija koje su tretirane hsa-miR-185-5p mimikom i HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelija koje su tretirane NT miRNK kontrolom (Studentov t test, $p_{CDC42}=0,107$, $p_{MDM2}=0,563$ i $p_{PKD1}=0,496$) (Slika R10; Tabela R12).

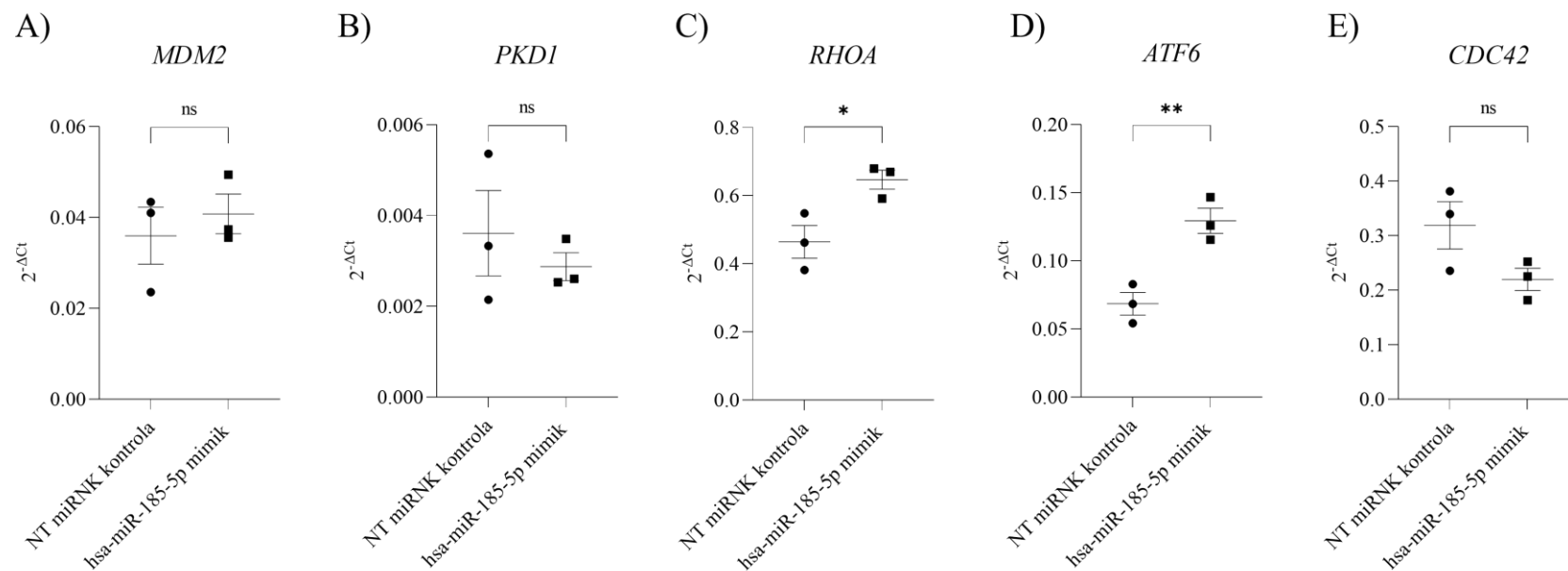
HEK293 WT ćelijska linija tretirana je odvojeno sa dve miRNK mimike, hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p mimikom.

Kada je HEK293 WT ćelijska linija tretirana hsa-miR-484 mimikom, identifikovano je smanjenje nivoa iRNK *MDM2* (FC=0,69 puta; Studentov t test, $p_{MDM2}=0,058$), smanjenje nivoa iRNK *NOTCH3* (FC=0,75; Studentov t test, $p_{NOTCH3}=0,003$) i povećanje nivoa iRNK *FISI* (FC=1,29; Studentov t test, $p_{FISI}=0,032$) u HEK293 WT ćelijama koje su tretirane hsa-miR-484 mimikom u poređenju sa HEK293 WT ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom. Nisu detektovane značajne razlike u nivoima iRNK *APAF1* i *PKD1* između HEK293 WT ćelija koje su tretirane hsa-miR-484 mimikom i HEK293 WT ćelija koje su tretirane NT miRNK kontrolom (Studentov t test, $p_{APAF1}=0,235$ i $p_{PKD1}=0,164$) (Slika R11; Tabela R12).

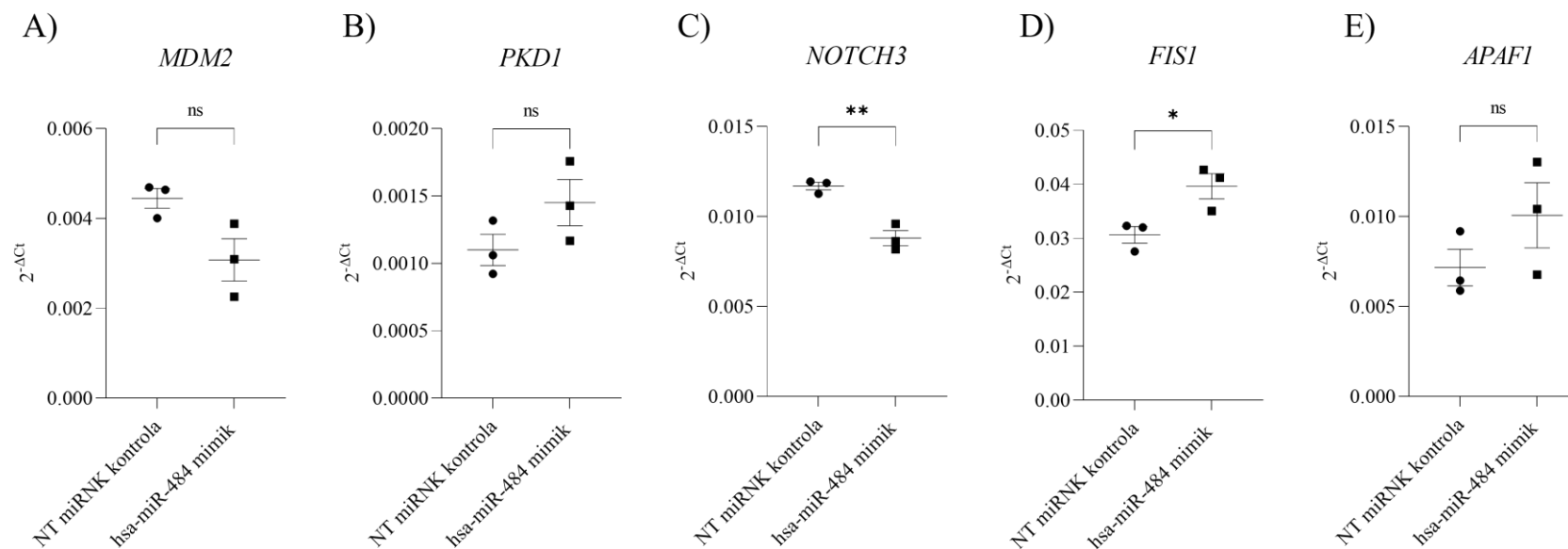
Kada je HEK293 WT ćelijska linija tretirana hsa-miR-185-5p mimikom, identifikovano je smanjenje nivoa iRNK *MDM2* (FC=0,60; Studentov t test, $p_{MDM2}=0,019$) i povećanje nivoa iRNK *ATF6* (FC=1,77; Studentov t test, $p_{ATF6}=0,008$) u HEK293 WT ćelijama koje su tretirane hsa-miR-185-5p mimikom u poređenju sa HEK293 WT ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom. Nisu detektovane značajne razlike u nivoima iRNK *RHOA*, *CDC42* i *PKD1* između HEK293 WT ćelija koje su tretirane hsa-miR-185-5p mimikom i HEK293 WT ćelija koje su tretirane NT miRNK kontrolom (Studentov t test, $p_{RHOA}=0,055$, $p_{CDC42}=0,169$ and $p_{PKD1}=0,307$). (Slika R12; Tabela R12).



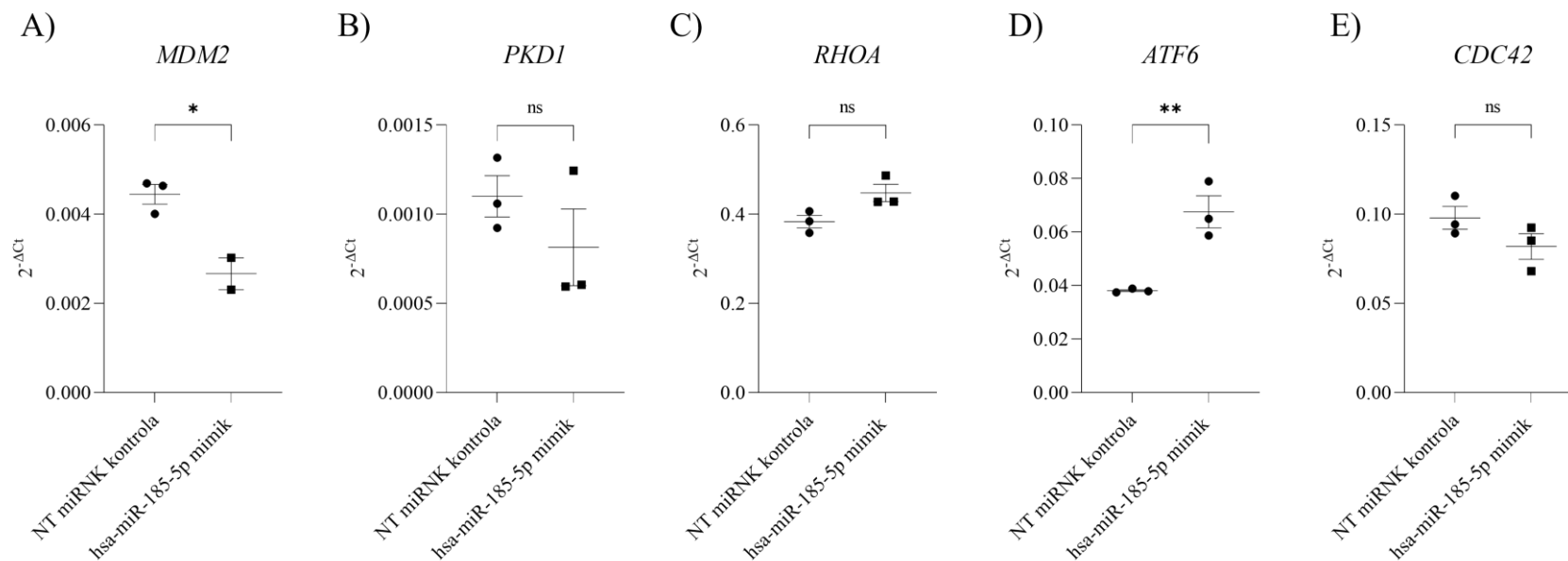
Slika R9. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-484 nakon tretmana HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijske linije hsa-miR-484 mimikom. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *GAPDH* korišćen je za normalizaciju rezultata. A) Relativna ekspresija *MDM2* gena, Studentov t test, $p_{MDM2}=0,377$ B) Relativna ekspresija *PKD1* gena, Studentov t test, $p_{PKD1}=0,759$ C) Relativna ekspresija *NOTCH3* gena, Studentov t test, $p_{NOTCH3}=0,035$ D) Relativna ekspresija *FIS1* gena, Studentov t test, $p_{FIS1}=0,940$ E) Relativna ekspresija *APAF1* gena, Studentov t test, $p_{APAF1}=0,198$. * – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,05$; ns – ne postoji značajna razlika između ispitivanih grupa. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2024.



Slika R10. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-185-5p nakon tretmana HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijske linije hsa-miR-185-5p mimikom. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *GAPDH* korišćen je za normalizaciju rezultata. A) Relativna ekspresija *MDM2* gena, Studentov t test, $p_{MDM2}=0,563$ B) Relativna ekspresija *PKD1* gena, Studentov t test, $p_{PKD1}=0,496$ C) Relativna ekspresija *RHOA* gena, Studentov t test, $p_{RHOA}=0,03$ D) Relativna ekspresija *ATF6* gena, Studentov t test, $p_{ATF6}=0,007$ E) Relativna ekspresija *CDC42* gena, Studentov t test, $p_{CDC42}=0,107$. * – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,05$; ** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,01$; ns – ne postoji značajna razlika između ispitivanih grupa. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2024.



Slika R11. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-484 nakon tretmana HEK293 WT ćelijske linije hsa-miR-484 mimikom. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *GAPDH* korišćen je za normalizaciju rezultata. A) Relativna ekspresija *MDM2* gena, Studentov t test, $p_{MDM2}=0,057$ B) Relativna ekspresija *PKD1* gena, Studentov t test, $p_{PKD1}=0,164$ C) Relativna ekspresija *NOTCH3* gena, Studentov t test, $p_{NOTCH3}=0,003$ D) Relativna ekspresija *FIS1* gena, Studentov t test, $p_{FIS1}=0,032$ E) Relativna ekspresija *APAF1* gena, Studentov t test, $p_{APAF1}=0,235$. * – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,05$; ** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,01$; ns – ne postoji značajna razlika između ispitivanih grupa. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2024.



Slika R12. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-185-5p nakon tretmana HEK293 WT ćelijske linije hsa-miR-185-5p mimikom. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Nivo ekspresije endogene kontrole *GAPDH* korišćen je za normalizaciju rezultata. A) Relativna ekspresija *MDM2* gena, Studentov t test, $p_{MDM2}=0,019$ B) Relativna ekspresija *PKD1* gena, Studentov t test, $p_{PKD1}=0,306$ C) Relativna ekspresija *RHOA* gena, Studentov t test, $p_{RHOA}=0,055$ D) Relativna ekspresija *ATF6* gena, Studentov t test, $p_{ATF6}=0,008$ E) Relativna ekspresija *CDC42* gena, Studentov t test, $p_{CDC42}=0,169$. * – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,05$; ** – postoji značajna razlika između ispitivanih grupa pri $p<0,01$; ns – ne postoji značajna razlika između ispitivanih grupa. Grafici objavljeni u Mitrović i sar., 2024.

Tabela R12. Relativna kvantifikacija ekspresije iRNK ciljnih gena hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p nakon tretmana ćelijskih linija miRNK mimikama.

Geni	Efekat tretmana hsa-miR-484 mimikom na ekspresiju ciljnih gena u HEK293 MIR484 KO ^{het} ćelijskoj liniji		Efekat tretmana hsa-miR-185-5p mimikom na ekspresiju ciljnih gena u HEK293 MIR185 KO ^{hom} ćelijskoj liniji		Efekat tretmana hsa-miR-484 mimikom na ekspresiju ciljnih gena u HEK293 WT ćelijskoj liniji		Efekat tretmana hsa-miR-185-5p mimikom na ekspresiju ciljnih gena u HEK293 WT ćelijskoj liniji	
	FC	p vrednost	FC	p vrednost	FC	p vrednost	FC	p vrednost
<i>MDM2</i>	1,21	0,378	1,13	0,563	0,69	0,058	↓ 0,60	0,019
<i>PKD1</i>	1,14	0,759	0,79	0,496	1,32	0,164	0,74	0,307
<i>NOTCH3</i>	↓ 0,82	0,035	N/A	N/A	↓ 0,75	0,003	N/A	N/A
<i>FIS1</i>	1,01	0,941	N/A	N/A	↑ 1,29	0,032	N/A	N/A
<i>APAF1</i>	1,86	0,198	N/A	N/A	1,4	0,235	N/A	N/A
<i>RHOA</i>	N/A	N/A	↑ 1,39	0,03	N/A	N/A	1,17	0,055
<i>ATF6</i>	N/A	N/A	↑ 1,89	0,008	N/A	N/A	↑ 1,77	0,008
<i>CDC42</i>	N/A	N/A	0,69	0,107	N/A	N/A	0,83	0,169

FC – pokazuje koliko je puta nivo ispitivane iRNK viši kod ćelija koje su tretirane miRNK mimikom u poređenju sa odgovarajućim ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom. N/A – (engl. *not applicable*). Zatamnjenim brojevima su označeni značajni rezultati. Tabela objavljena u Mitrović i sar., 2024.

5. Diskusija

Budući da je poznato da su miRNK lokalizovane u retkim CNV regionima orijentisane ka regulaciji osnovnih bioloških procesa kao što su rast, razviće i diferencijacija (Wu i sar., 2012; Qiao i sar., 2013) i da su ovi procesi osetljivi na promene u ekspresiji gena koji su uključeni u iste tj. da njihova radikalna fluktuacija smanjuje fitnes organizma, glavni fokus istraživanja u okviru ove disertacije bio je izučavanje miRNK koje su lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa nastankom CAKUT-a i njihov funkcionalni uticaj na ekspresiju gena uključenih u nastanak CAKUT-a. U okviru ove teze, procenjeno je globalno opterećenje gena za miRNK, retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Takođe su identifikovane i funkcionalno interpretirane miRNK najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. U cilju detaljnijeg izučavanja efekta retkih CNV regiona na ekspresiju i funkciju miRNK, dizajnirani su *in vitro* modeli koji prikazuju heterozigotnu deleciju gena *MIR484* i homozigotnu deleciju gena *MIR185*. Na ovaj način je potvrđeno da retki CNV regioni zaista utiču na ekspresiju hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p, miRNK lociranih u njima i posledično na izmenjenu ekspresiju ciljnih gena odabranih miRNK.

5.1. Opterećenje gena koji kodiraju miRNK CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

Poslednjih godina, i CNV regioni i miRNK su prepoznati kao važni molekularni faktori koji su uključeni u etiologiju CAKUT-a. Istraživanja su pokazala da su miRNK koje su lokalizovane u CNV regionima uključene u mnoge patologije, uključujući autizam (Vaishnavi i sar., 2013), šizofreniju (Warnica i sar., 2015), zastoj u razvoju (Qiao i sar., 2013) i kancer (Zhang i sar., 2006; Rossi i sar., 2008; Kumaran i sar., 2018). Međutim, u većini studija koje istražuju molekularno genetičku osnovu razvoja CAKUT-a, funkcionalni uticaj CNV regiona i miRNK je ispitan odvojeno.

Prethodna istraživanja su pokazala značajnu asocijaciju između velikih retkih CNV regiona i CAKUT-a (Sanna-Cherchi i sar., 2012; Westland i sar., 2015; Siomou i sar., 2017; Verbitsky i sar., 2019; Ahn i sar., 2020). Povećano opterećenje gena koji kodiraju miRNK CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om pruža alternativno objašnjenje za anomalije asocirane sa retkim CNV regionima, s obzirom na to da pojedinačne miRNK mogu regulisati različite mreže genoma. Dodatno, ukoliko se u okviru CNV regiona nalazi gen koji kodira miRNK, a ovaj region ne obuhvata protein kodirajući gen, takav CNV region potencijalno ne bi mogao da se identifikuje u studijama sekvenciranja egzoma, iako može predstavljati rizik za nastanak CAKUT-a.

U ovoj studiji, urađena je bioinformatička pretraga preklapanja gena koji kodiraju miRNK i CNV regiona koji su asocirani sa CAKUT-om da bi se isključilo nasumično preklapanje i utvrđeno je opterećenje gena, tj. koji geni koji kodiraju miRNK su obogaćeni u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Rezultati analize nisu pokazali pristrasnost koja može nastati usled različite distribucije gena koji kodiraju miRNK na hromozomima. Naime, analizom je pokazano da svi hromozomi imaju veoma slične odnose dužine gena koji kodiraju miRNK u odnosu na dužinu hromozoma, osim hromozoma 17 i 19. Primećeno je takođe da su događaji duplikacija prisutni na većem broju hromozoma u poređenju sa delecijama. Ovakav trend je primećen i u drugim studijama (Marcinkowska i sar., 2011; Wu i sar., 2012; Veerappa i sar., 2014). Geni koji su lokalizovani u ovim CNV regionima takođe pokazuju tendenciju da budu češće lokalizovani u CNV duplikacijama u poređenju sa CNV delecijama. Korelaciona analiza koja je urađena između broja jedinstvenih gena za miRNK koji se preklapaju sa retkim CNV regionima i dužine CNV regiona u odnosu na dužinu hromozoma, pokazala je da kod određenih hromozoma postoji povećanje ili smanjenje broja gena koji kodiraju miRNK u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, u odnosu na linearnu

zavisnost. Takvi hromozomi su bili hromozom 16 koji obuhvata veći broj gena koji kodiraju miRNK u delecijama i duplikacijama, kao i hromozomi 20 i 21 na kojima je lokalizovan manji broj gena koji kodiraju miRNK u retkim delecijama i duplikacijama.

Mora biti naglašeno da su zaključci doneti kroz analizu opterećenja opservacioni i da su neophodni dalji analitički pristupi u cilju identifikacije preferencijalno pogođenih hromozoma i miRNK, što je bilo izvan okvira ove studije. Međutim, rezultati sugerišu da pomenuti hromozomi u kojima je uočeno obogaćenje gena za miRNK u retkim CNV regionima predstavljaju dobre kandidate za buduća istraživanja varijabilnosti CAKUT fenotipa.

5.2. Identifikacija i bioinformatička interpretacija miRNK i miRNK familija koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om

Skoro 80% pacijenata sa CAKUT-om je imalo najmanje jedno preklapanje miRNK gena sa identifikovanim retkim CNV-om. Iako je ovo najsveobuhvatnija studija ovog tipa do sada, važno je naglasiti da fenotipovi CAKUT-a nisu bili podjednako zastupljeni, što predstavlja ograničenje koje bi se trebalo uzeti u obzir prilikom planiranja budućih studija. Ipak, sedam od deset najčešće pogođenih gena za miRNK identifikovanih u našoj analizi su takođe pronađene i u prethodnoj studiji o CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om (*MIR484*, *MIR185*, *MIR6506*, *MIR2909*, *MIR378j*, *MIR3618* i *MIR1306*) (Caruana i sar., 2015). U tom istraživanju je pokazano da CNV regioni sadrže gene koji kodiraju miRNK kod skoro 50% pacijenata sa CAKUT-om, ali je urađena na relativno maloj grupi i stoga ne uzima u obzir druge CNV regione koji su asocirani sa CAKUT-om, ali ipak podržava hipotezu o potencijalnoj vezi miRNK u CNV regionima sa CAKUT-om.

Analiza mreže miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, filtrirana za interakcije u tkivu bubrega, identifikovala je dominantnu regulaciju dve miRNK, hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p. Ove miRNK imaju najveći broj interakcija sa ciljnim genima, kao i najveći broj zajedničkih ciljnih gena. Analiza obogaćenja je pokazala obogaćenje molekularnih puteva u ciljnim genima miRNK koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Među najznačajnijim putevima izdvaja se signalni put neurotrofina. Neurotrofini su familija proteina koji imaju osnovnu ulogu u opstanku, razvoju i funkciji neurona. Kod sisara, pored ove osnovne uloge, neurotrofini i njihovi receptori važni su i u ostalim ćelijama, što potvrđuje njihova detekcija u različitim organima (Sariola, 2001; Johansson i sar., 2008; Gatta i sar., 2014; Cacialli i sar., 2018; Germana i sar., 2020; Cacialli, 2022), uključujući i bubrege (Karavanov i sar., 1995; Huber i sar., 1996; De Girolamo i sar., 2004). Neurotrofini i njihovi receptori su uključeni u različite procese kako bi se osiguralo pravilno funkcionisanje bubrega, kao što su rast i diferencijacija. Funkcionalne studije na modelima miševa i na pacijentima, pokazali su postojanje asocijacije između puteva u koje su uključeni neurotrofini i njihovi receptori i bolesti bubrega (Hahn i sar., 2011; Tao i sar., 2018; Fedou i sar., 2020). Pokazano je da je receptor neurotrofina p75 (p75NTR) u bubrezima miša bio visoko eksprimiran tokom prenatalnog perioda, dok se nakon rođenja ekspresija brzo smanjuje. U humanom kontrolnom fetalnom bubregu, p75NTR je lokalizovan unutar tela u obliku zareza i slova S, kao i zrelih glomerulima, dok je kod bubrega fetusa sa CAKUT-om, lokalizacija ovog receptora često bila izmenjena. Analiza ekspresije p75NTR u amnijskoj tečnosti pokazala je značajno smanjenje ekspresije p75NTR kod fetusa sa CAKUT-om u poređenju sa kontrolnim fetusima. Ovi rezultati ukazuju da je ekspresija p75NTR bitna za ranu nefrogenezu i da ima ulogu u nastanku CAKUT-a (Fedou i sar., 2020). Zbog svega navedenog, kako bi se potvrdio efekat retkog CNV regiona na ekspresiju miRNK, hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p su odabrane kao kandidati za funkcionalnu studiju, urađenu u ovoj disertaciji.

Imajući u vidu da geni koji kodiraju istu miRNK mogu biti na različitim genomskim lokacijama, kao i da miRNK iz iste familije imaju sufikse u svojoj anotaciji, urađena je dodatna analiza familija miRNK uklanjanjem sufiksa iz anotacije miRNK koje su identifikovane u retkim CNV regionima. Ovaj pristup omogućio je identifikaciju familija miRNK koje su često pogođene, iako su različiti članovi familije bili pogođeni kod relativno malog broja pacijenata.

Analiza najčešće pogođenih miRNK familija u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om ukazala je na značajno obogaćenje familije miR-548. Pojedinačni članovi familije miR-548 su bili lokalizovani u CNV regionima kod malog broja pacijenata, pa se nisu ni našli među prvih deset miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om. Međutim, nakon uklanjanja sufiksa u anotaciji miRNK, familija miR-548 je identifikovana kao jedna od najčešće pogođenih miRNK familija u retkim CNV regionima. Familija miR-548 je velika familija miRNK specifična za primata i sastoji se od čak 73 prekursora koji se prepisuju sa skoro svakog hromozoma čoveka (*miRBase Release 22.1*) (Piriyapongsa i Jordan, 2007). Zanimljivo je da dok su članovi ove miRNK familije dosta lokalizovani u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om, polimorfni CNV regioni koji se javljaju u opštoj populaciji gotovo da ne preklapaju ovu familiju miRNK, bez obzira na njihov relativno veliki broj i rasprostranjenost na većini hromozoma. Ovo sugerise na eventualno postojanje evolucionog pritiska na CNV regione koji obuhvataju gene familije miR-548, tj. njihovu važnu ulogu u fitnessu organizma.

Članovi familije miR-548 regulišu diferencijaciju podocita *in vitro*, što je važno za razvoj bubrega (Christofides i sar., 2020). Pokazalo se da je glavno čvorište mreže interakcija familije miR-548, GPC4, važan faktor u morfogenezi regulisanoj faktorom rasta hepatocita (HGF) (Karumanchi i sar., 2001). Studije na ćelijskim linijama i genetički modifikovanim miševima su ukazale na nekoliko faktora rasta, uključujući faktor rasta hepatocita, kao važne regulatore razvoja nefrona i grananja ureterovog pupoljka (Barasch i sar., 1999; Barasch i sar., 1999; Clark i Bertram, 1999). GPC4 pripada familiji proteina GPC koji su lokalizovani na ćelijskoj membrani i predstavljaju receptore za HGF. Pokazalo se da se ekspresija GPC4 povećava tokom nefrogeneze, kada HGF ispoljava značajan morfogeni efekat na tubule, čime potencijalno reguliše kasnu fazu formacije tubula (Karihaloo i sar., 2004).

Analizom mreže interakcija ciljnih gena i članova familije miR-548, prisutnih u retkim CNV regionima u CAKUT-u, uočeno je značajno obogaćenje molekularnih puteva, koji utiču na ključne razvojne procese. Među najznačajnijim molekularnim putevima nalaze se neki koji imaju globalni uticaj na razviće, kao što su putevi formacije dorzo-ventralne ose, međućelijskih veza i regulacije aktinskog citoskeleta. Takođe, neki od ovih puteva imaju važnu ulogu u razviću bubrega kao što je Erb-B signalni put. Familija Erb-B receptora pripada prvoj podklasi receptora tirozinskih kinaza i uključuje četiri srodna receptora. EGF (engl. *epidermal growth factor*) se vezuje za Erb-B receptore, što inicira dalju intracelularnu signalizaciju. Rekombinantni EGF stimulisao je rast kultivisanih embrionalnih ćelija bubrega (Sakurai i sar., 1997), dok su epiregulin i AR (ligandi Erb-B receptora) pojačali grananje ureterovog pupoljaka (Kim i sar., 2007). *In vitro* inhibicija aktivnosti Erb-B receptora dovela je do smanjenja razvoja ureterovih pupoljaka (Rogers i sar., 1992; Sakurai i Nigam, 1998). Kod nokaut miševa za Erb-B receptor ne dolazi do razvoja nekoliko organa, uključujući bubrege, a ovi miševi umiru ubrzo nakon rođenja (Threadgill i sar., 1995). Ove informacije ukazuju da su članovi Erb-B familije aktivni u procesu nefrogeneze, što je podržano i brojnim drugim studijama (Bernardini i sar., 1996; Nakanishi i sar., 2001; Zeng i sar., 2007; Carev i sar., 2008).

Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da su miRNK članovi familije miR-548 potencijalno važni genetički faktori za nastanak i fenotipsku varijabilnost CAKUT-a. Izmenjena ekspresija članova familije miR-548 uzrokovana retkim CNV regionima u CAKUT-u bi stoga trebalo da se istraži u budućim studijama.

5.3. Analiza miRNoma HEK293 WT, HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijskih linija

U ovoj studiji, urađena je analiza miRNoma sve tri ćelijske linije (HEK293 WT, HEK293 MIR484 KO^{het} i HEK293 MIR185 KO^{hom}), kako bi se utvrdilo eventualno postojanje razlike u nivou najviše eksprimiranih miRNK. Na osnovu rezultata multidimenzionog skaliranja može se zaključiti da postoje razlike u profilima ekspresije miRNK između ispitivanih ćelijskih linija. Međutim, daljom analizom je utvrđeno da je broj miRNK sa značajnom razlikom u ekspresiji između ispitivanih linija veoma mali u odnosu na ukupan broj identifikovanih miRNK (hsa-miR-130a-3p je identifikovana kao diferencijalno eksprimirana miRNK između HEK293 WT i HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijskih linija, dok je hsa-miR-1246 identifikovana kao diferencijalno eksprimirana miRNK između HEK293 WT i HEK293 MIR185 KO^{hom} ćelijskih linija). Ovo može sugerisati na suptilne promene koje rezultuju razdvajanjem na MDS dijagramu. Iako su identifikovane diferencijalno eksprimirane miRNK, efekat manipulacije dozom gena za miRNK na promenu ekspresije miRNK nije bio značajno naglašen što dodatno podržava zaključke donete u ovoj studiji, a koji se odnose na efekat izmenjenog nivoa pojedinačne miRNK.

Povezanost između hsa-miR-130a-3p i hsa-miR-484 ni u jednoj dosadašnjoj studiji nije identifikovana, međutim postoji mogućnost da ove dve miRNK mogu biti indirektno povezane putem regulatornih mreža. Na ovaj način, ove dve miRNK mogu delovati na iste ili povezane signalne puteve, što može dovesti do njihove međusobne regulacije putem zajedničke mreže ciljnih gena. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se bolje razumela interakcija ove dve miRNK. Sa druge strane, istraživanja o povezanosti hsa-miR-1246 i hsa-miR-185 nisu obimna, ali je pokazano da su obe miRNK povezane sa kancerom gde ko-detekcija ove dve miRNK u plazmi omogućavaju tačno razlikovanje pacijenata sa metastatskim melanomom od zdravih osoba (Armand-Labit i sar., 2016). Moguće je da su ove dve miRNK povezane putem funkcije koju obavljaju u različitim patološkim stanjima, a ne putem zajedničkih ciljnih gena, ali bi svakako ovu hipotezu trebalo ispitati u budućim studijama.

Ova analiza ukazuje na važnost istraživanja aditivnog efekta molekula miRNK na ekspresiju ciljnih gena, budući da miRNK koje dele zajedničke ciljne gene mogu kroz pomenuti mehanizam regulacije dovesti do njihove pojačane inhibicije (Gatsiou i sar., 2021; Mansoori i sar., 2021).

5.4. CNV regioni utiču na promenu u ekspresiji miRNK kandidata *in vitro* i posledično na promenu u ekspresiji njihovih ciljnih gena

U ovoj tezi rađena je funkcionalna studija kako bi se eksperimentalno potvrdio efekat retkog CNV regiona koji je asociran sa CAKUT-om na ekspresiju miRNK kandidata i posledično na promenu nivoa iRNK odabranih ciljnih gena usled izmenjene ekspresije miRNK. Restitucijom nivoa miRNK kandidata, miRNK mimikama u dva ćelijska modela koji prikazuju odgovarajuće promene u genomu identifikovane kod pacijenata sa CAKUT-om izučavan je translacioni potencijal u cilju ponovnog uspostavljanja izmenjene ekspresije ciljnih gena.

Za funkcionalnu studiju, korišćena su dva modela HEK293 ćelijskih linija. U prvom modelu koji oslikava stanje kod pacijenata sa CAKUT-om, uvedena je heterozigotna delecija gena *MIR484* u HEK293 ćelijsku liniju. Najveći modul interakcija miRNK koje su najčešće lokalizovane u CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena je grupisan oko hsa-miR-484 zbog čega je odlučeno da heterozigotna nokaut ćelijska linija koja oslikava stanje kod pacijenata sa CAKUT-om bude modifikovana baš za ovu miRNK. Međutim u ovom modelu i dalje postoji rezidualna ekspresija hsa-miR-484, zbog čega je uveden drugi, bolje kontrolisan ćelijski model sa homozigotnim nokautom gena *MIR185*, kako bi dobili dodatne informacije o efektu retkih delecija na funkciju hsa-miR-185-5p. Očekivalo se da će ovaj model imati izraženije efekte delecije gena za

miRNK na promene u ekspresiji gena. Takođe, uvođenje hsa-miR-185-5p u analizu pruža novu perspektivu o uticaju CNV regiona na ekspresiju miRNK koje su lokalizovane u njima. Ovo je u skladu sa prethodnim studijama u kojima se istraživanje potencijalnog genetičkog uzročnika CAKUT-a koji je lokalizovan u retkom CNV regionu vrši uvođenjem potpunog nokauta gena kandidata u model organizam (Verbitsky i sar., 2019).

Funkcionalna studija je potvrdila da uvedena heterozigotna delecija gena *MIR484*, kao što je identifikovano kod pacijenata sa CAKUT-om, može značajno da smanji nivo hsa-miR-484 *in vitro*, dok ekspresija hsa-miR-185-5p nije detektovana u ćelijskoj liniji u kojoj je uveden nokaut za gen *MIR185*. Pored toga, određeni ciljni geni ove dve miRNK su pokazali izmenjen nivo ekspresije u ćelijama sa heterozigotnom delecijom gena *MIR484* i homozigotnom delecijom gena *MIR185* u odnosu na HEK293 WT ćelijsku liniju, što sugerise da bi ovi događaji mogli imati značajan uticaj na penetrabilnost i ekspresivnost CAKUT-a, pa čak i da se predlože kao potencijalni genetički uzročnici u slučajevima CAKUT-a gde se ne zna tačan genetički uzročnik u okviru retkog CNV regiona.

MDM2 je glavni negativni regulator tumor supresorskog gena *p53* (Bond i sar., 2005). Iniciranje apoptoze i zaustavljanja ćelijskog ciklusa pomoću p53, naglašava potrebu za strogom kontrolom aktivnosti p53 tokom razvića, ističući kritičnu ulogu MDM2 u negativnoj regulaciji p53 proteina. U bubrezima, MDM2 je uključen u regulaciju ćelijskog ciklusa podocita, parijetalnih i tubularnih epitelnih ćelija, kao i infiltraciju inflamatornih ćelija tokom različitih patogenih stimulusa (Mulay i sar., 2012; 2013; 2016). Pored svoje uloge u nadzoru ćelijskog ciklusa, MDM2 takođe pokazuje i značajnu ulogu u razviću i bolestima bubrega. p53^{-/-} embrioni miša su razvili spektar urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta (Saifudeen i sar., 2009). Nivo ekspresije *p53* u bubrezima opada za približno 50% od embrionalnog do odraslog doba (Aboudehen i sar., 2012). Ekspresija MDM2 je povezana sa patofiziološkim procesima kao što su inflamacija i fibroza (Thomasova i sar., 2012), koji imaju ključnu ulogu u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji. Povećana ekspresija *MDM2* je takođe primećena u tubulointersticijumu pacijenata sa tubulointersticijskom fibrozom i unilateralnom opstrukcijom uretera (engl. *Unilateral ureteral obstruction* – UUU) kod miševa (Ye i sar., 2017), ukazujući na njegovu ulogu u procesima povezanim sa oštećenjem bubrega.

MDM2 je ciljni gen obe istraživane miRNK, za koji se pokazalo da je povećano eksprimiran u nokaut ćelijskim linijama u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom. Na ovaj način, potvrđeno je da je smanjena ekspresija i hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p povezana sa povećanom ekspresijom *MDM2*, što je takođe sugerisano analizom mreže.

Mutacije u *PKD1* su asocirane sa većinom slučajeva autozomno dominantnog oblika policistične bolesti bubrega (ADPBB), naslednog oboljenja kog karakteriše razvoj cista na bubrezima i progresivni gubitak bubrežne funkcije (Hughes i sar., 1995). PKD1 protein eksprimiran je u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i endotelu (Griffin i sar., 1997) i ima ulogu u strukturnom i funkcionalnom integritetu vaskulature, a time i u patogenezi vaskularnih promena uočenih u ADPBB (Kim i sar., 2000). Pokazalo se da *PKD1* ili nedovoljno eksprimiran (Lantingavan Leeuwen i sar., 2007; Leonhard i sar., 2015) ili prekomerno eksprimiran (Pritchard i sar., 2000; Thivierge i sar., 2006) izaziva PKD na životinjskim modelima, zbog čega je predloženo da je uravnotežen nivo funkcionalnog proteina PKD1 važan za održavanje tubularne arhitekture (Leonhard i sar., 2016). Iako ADPBB ne pripada spektru fenotipova CAKUT-a, Liu i saradnici (2022) su pokazali da bi PKD1 mogao imati moguću ulogu u razvoju CAKUT-a.

Posmatrajući mrežu interakcija najčešće lokalizovanih miRNK u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena, zaključeno je da hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p regulišu ekspresiju *PKD1*. Međutim, nismo uočili razliku u nivou ekspresije iRNK *PKD1* u nokaut ćelijskim linijama u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom. Sa druge strane, ne može se sa sigurnošću isključiti da hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p ne regulišu ekspresiju *PKD1*, jer

regulacija može da se dešava i na nivou proteina, potencijalno uključujući mehanizme kao što su translaciona represija i destabilizacija, naglašavajući složenu prirodu regulacije ekspresije gena, van regulacije transkripcije. S obzirom da predmet ove doktorske disertacije nije bilo merenje ekspresije na nivou proteina, pretpostavku o efektu hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p na translacionu represiju PKD1 je neophodno ispitati u narednim istraživanjima.

NOTCH signalizacija funkcioniše kao jedan od glavnih puteva koji određuju ćelijski identitet tokom razvoja, a ima funkciju u ćelijskoj komunikaciji. Ćelije se razlikuju jedna od druge prema tome da li pretežno šalju ili primaju NOTCH signale, odnosno kakva je distribucija liganda i receptora (Artavanis-Tsakonas i sar., 1999). Kod sisara postoje četiri receptora (NOTCH 1–4) i pet različitih liganada (Delta-like 1, 3, 4 i Jagged 1 i 2). Receptori i ligandi su transmembranski proteini tip I (Yuan i sar., 2020). NOTCH signalizacija je inicirana ekspresijom liganda na ćeliji koja šalje signal. Interakcija liganada sa NOTCH receptorima koji su eksprimirani na ćeliji koja prima signal, pokreće seriju proteolitičkih sečenja, od strane metaloproteaze iz porodice ADAM i kompleksa gama sekretaze. Ovo rezultuje oslobađanjem NOTCH intracelularnog domena (NICD), koji se translocira u nukleus gde se vezuje za druge regulatore transkripcije kako bi aktivirao transkripciju ciljnih gena, uglavnom iz Hes i Hey familije gena, koji funkcionišu kao transkripcioni faktori (Sirin i Susztak, 2012). Ovaj put transdukcije signala koji se koristi u većini procesa zavisnih od NOTCH-a poznat je kao kanonski put signalizacije NOTCH-a.

NOTCH signalni put je evoluciono očuvan signalni put koji ima značajnu ulogu u ranim fazama nefrogeneze (Chung i sar., 2016; Mukherjee i sar., 2019). Iako, NOTCH signalni put ima složenu ulogu u orkestriranju razvića bubrega (Mukherjee i sar., 2019), njegova supresija je neophodna za terminalnu diferencijaciju. Kada je razvoj bubrega završen, ovaj signalni put je uglavnom utišan, a samo nekoliko ćelija ostaju pozitivne na NOTCH kod odraslog bubrega. Nekoliko nedavnih studija pokazalo je reaktivaciju ovog puta u različitim poremećajima bubrega. Dokumentovana je povećana ekspresija *Notch3* u bubrezima miša koji je bio model sistem za PKD i u bubrezima pacijenata sa autozomno dominantnim PKD (Idowu i sar., 2018). Povećana ekspresija *Notch3* je takođe primećena u bubrežnim tubularnim epitelnim ćelijama kod miševa sa jednostranom opstrukcijom uretera (Djudjaj i sar., 2012), kao i kod pacijenata sa opstruktivnom nefropatijom (Huang i sar., 2018). Njegova aktivacija u glomerulu pospešuje brz tok bubrežne insuficijencije utičući na migratorne i proinflamatorne puteve (El Machhour i sar., 2015). Zajedno, ovi dokazi podržavaju jedinstven doprinos NOTCH3 signalizacije u bubrezima prilikom povrede bubrega izazvane opstrukcijom. S druge strane, istraživanje na *Notch3* nokaut miševima (*Notch3*^{-/-}) pokazalo je da nedostatak Notch3 remeti bubrežnu hemodinamiku (Boulos i sar., 2011). S obzirom da je Notch3 uključen u sazrevanje i diferencijaciju glatkih mišićnih ćelija vaskularnog zida, nedostatak kontraktilnosti aferentnih arteriola ovih životinja ukazuje na abnormalnu strukturu vaskularnog zida kao mogući uzrok ovog nedostatka.

Iako se očekivalo da će *NOTCH3* biti povećano eksprimiran u ćelijskoj liniji sa heterozigotnim nokautom gena *MIR484* u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom, kao što je slučaj sa *MDM2* genom, naši rezultati su pokazali suprotno, primećena je smanjena ekspresija *NOTCH3*. Ovaj naočekivan rezultat iako ukazuje na moguću ulogu hsa-miR-484 u regulaciji ekspresije *NOTCH3*, što može imati implikacije na funkciju i patogenezu vezanu za NOTCH3 signalizaciju, takođe ukazuje i da postoje potencijalni dodatni mehanizmi koji utiču na ekspresiju *NOTCH3*. Ekspresija ovog gena je regulisana sa više miRNK (Song i sar., 2009; Ghisi i sar., 2011; Kang i sar., 2021) što ukazuje na kompleksnu regulaciju NOTCH3 signalnog puta i potencijalnu ulogu drugih regulatornih faktora u ovom procesu. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se razumela veza između *NOTCH3* gena i hsa-miR-484 i razumelo njeno biološko značenje.

FIS1 je uključen u deobu mitohondrija, oblikovanje mitohondrijalne morfologije i apoptozu (Gomes i sar., 2008; Iwasawa i sar., 2011). Morfologija mitohondrija je dinamički regulisana ciklusima fisije i fuzije (Detmer i Chan, 2007), koji su ključni regulatori nekoliko ćelijskih procesa,

kao što su progresija ćelijskog ciklusa i apoptoza (Mitra, 2013; Pernas i Skorano, 2016). Tokom aktivacije mitohondrijske fisije, protein DRP1 se vezuje za adapterske proteine koji se nalaze na spoljašnjoj membrani mitohondrije. Rekrutovanje DRP1 se postiže pomoću proteina FIS1. Oba ova proteina, i FIS1 i DRP1 su očuvani kod ljudi (Labbe i sar., 2014) i za oba proteina je već pokazano da su uključeni u održavanje i diferencijaciju matičnih ćelija (Seo i sar., 2018). Štaviše, DRP1 stimuliše Bax oligomerizaciju, koja indukuje oslobađanje citohroma c u citosol, gde može aktivirati kaspaznu kaskadu. Ova kaskada rezultuje formiranjem kompleksa sa APAF1, što dalje pospešuje formiranje apoptozoma, na taj način indukujući apoptotski mehanizam (Montessuit i sar., 2010). Ovaj mehanizam ukazuje na povezanost između fisije mitohondrija i apoptoze. Pored toga, FIS1 intereaguje sa BAP31, proteinom koji je lokalizovan na ER membrani, nakon čega ga katalitički seče, stvarajući p20 BAP31. p20 BAP31, deluje kao pro-apoptotski protein tako što konvertuje prokaspazu-8 u aktiviranu formu čime inicira i promovise apoptozu (Iwasawa i sar., 2011). Interesantno je napomenuti da se tokom apoptoze, fisija mitohondrija drastično povećava zbog masovnog regrutovanja DRP1 iz citosola do spoljašnje membrane mitohondrija (Hoppins i Nunnari, 2012).

Inflamacija bubrega i oštećenje tkiva tokom akutne bubrežne insuficijencije i hronične bubrežne insuficijencije povezani su sa strukturnim i funkcionalnim promenama mitohondrija (Maekawa i sar., 2019; Chung i sar., 2019). Takođe, pokazalo se da su uslovi potrebni za diferencijaciju intestinalnih sekretornih ćelija, povećanje mitohondrijske fisije putem FOXO/NOTCH signalizacije. Ovo je praćeno pojačanom deobom mitohondrija, što je izazvano hsa-miR-484 posredovanom regulacijom FIS1 (Ludikhuizen i sar., 2020) što naglašava važnost mitohondrija u određivanju sudbine matičnih ćelija.

Iako postoje dokazi da je FIS1 ciljni gen hsa-miR-484 (Wang i sar., 2012), razlika u nivoima ekspresije iRNK *FIS1* u HEK293 MIR484 KO^{het} u poređenju sa HEK293 WT nije uočena. Potencijalni razlog za nepostojanje promene na nivou iRNK može biti zbog specifične hsa-miR-484 regulacije ekspresije proteina FIS1 vezivanjem za sekvencu iRNK koja kodira protein FIS1 (Wang i sar., 2012) i na taj način inhibira njegovu translaciju i smanjuje samo količinu proteina. Pored toga, budući da FIS1 učestvuje u apoptozi i dinamici mitohondrija, koja uključuje fuziju, fisiju i mitohondrijalnu autofagiju (mitofagija) (Ihenacho i sar., 2021) i da je neophodan za smanjenje mitohondrijalnih reaktivnih vrsta kiseonika (Liou i sar., 2022), verovatno je da će biti regulisan brojnim faktorima.

APAF1, ima centralnu ulogu u procesu apoptoze. Ekspresija proteina APAF1 je ograničavajući faktor u formiranju apoptozoma i signalizaciji tokom procesa apoptoze (Yoshida i sar., 1998; Hausmann i sar., 2000). Kao posledica izmenjene permeabilnosti mitohondrijske membrane, citohrom c se oslobađa iz mitohondrija u citosol gde stupa u interakciju sa APAF1. Nakon toga, sedam APAF1-citohrom c jedinica oligomerizuje formirajući kompleks nazvan apoptozom koji zatim vezuje prokaspazu-9. Blizina monomera prokaspaze-9 indukuje njihovu aktivaciju i dimerizaciju u aktivnu kaspazu-9, koja zatim aktivira kaspazu-3 i kaspazu-7 (Shakeri i sar., 2017).

Apoptoza ima važnu ulogu u remodelovanju bubrega u fiziološkim uslovima. Takođe je povezana sa gubitkom ćelija i strukturnim oštećenjem kod hronične bubrežne insuficijencije (Padanilam, 2003; Verzola i sar., 2004; Sekine i sar., 2012). Song i saradnici (2017) su pokazali da se nivoi ekspresije APAF1 i kaspaze-9 postepeno povećavaju tokom embrionalnog perioda, a najviši nivo ekspresije dostižu tokom ranog postnatalnog perioda razvoja bubrega.

Sadašnji rezultati otkrivaju da je smanjenje nivoa ekspresije hsa-miR-484 u HEK293 MIR484 KO^{het} ćelijama povezano sa regulacijom APAF1. Njegova regulacija bi mogla da utiče na apoptozu tokom razvoja bubrega i da poremeti normalan razvoj bubrega. Nedavno je pokazano da osim svoje uloge u apoptozi, APAF1 ima ulogu u stabilnosti centrozoma (Ferraro i sar., 2011). Centrozom je važan za deobu ćelija, migraciju ćelija i regulaciju ćelijskog ciklusa, za koje je takođe

primećeno da su obogaćeni genima iz mreže interakcija miRNK koje su najčešće lokalizovane u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena. *In vivo* povećanje broja centrozoma poremetilo je proliferaciju i diferencijaciju bubrežnih progenitora, što je rezultiralo defektnom morfogeneza grananja i hipoplazijom bubrega (Dionne i sar., 2018). Stoga bi regulacija *APAF1* mogla imati ključnu ulogu u razvoju bubrega. Nedavno je dokumentovano da su centriole potrebne da regulišu apoptozu posredovanu p53 u grananju pluća i razvoju endoderma što sugerše vezu između centriola i apoptoze (Xie i sar., 2021).

Poremećaji u ćelijskoj homeostazi mogu dovesti do ER stresa koji se sastoji od akumulacije pogrešno savijenih proteina koji mogu formirati agregate unutar lumena ER. Kao odgovor na to, dolazi do aktivacije transkripcionog faktora ATF6. U fiziološkim uslovima, ATF6 je vezan za BiP šaperone, koji ga održavaju u neaktivnom stanju. Međutim, nakon nagomilavanja pogrešno savijenih proteina u ER, BiP se odvaja od ATF6, omogućavajući translokaciju ATF6 sa ER membrane do Goldžijevog aparata, gde prelazi u svoju aktivnu formu. Aktivirani ATF6 dalje reguliše aktivaciju CHOP-a, centralnog posrednika apoptoze indukovane ER stresom (Lenna i Trojanowska, 2012). Aktivacija ATF6 je takođe identifikovana tokom fibrotskih procesa kod UOU modela (Chiang i sar., 2011). Autori su pokazali da u ovom modelu produženi ER stres dovodi do trajne aktivacije ATF6-CHOP proapoptotskog puta, koji dovodi do apoptoze tubularnih ćelija i naknadne bubrežne fibroze.

Kako su Yuan i saradnici (2020) pokazali da hsa-miR-185-5p reguliše ekspresiju *ATF6*, očekivalo se da je ekspresija ovog gena povećana u HEK293 *MIR185 KO^{hom}* u odnosu na HEK293 WT ćelijsku liniju. Međutim, naši rezultati su pokazali samo trend povećanja nivoa ekspresije iRNK *ATF6* u ćelijskoj liniji sa homozigotnim nokautom gena *MIR185* u odnosu na HEK293 WT ćelijsku liniju. Ovo može biti posledica razlika između tipova ćelija koje su korišćene u studijama. Ovi rezultati ukazuju na kompleksnost regulacije između miRNK i njihovih ciljnih gena, istovremeno sugeršući mogući uticaj unutarćelijskih faktora na ovu interakciju. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se detaljnije istražili mehanizmi koji stoje iza ove regulacije i kako bi se bolje razumela uloga hsa-miR-185-5p u kontekstu CAKUT-a. U tu svrhu mogu se koristiti drugi ćelijski modeli kao što su primarne ćelijske linije ili organoidi bubrega koji nude nove perspektive za otkrivanje potencijalnih mehanizama.

Podocite su ćelije sa kompleksnom arhitekturom aktinskog citoskeleta, koje imaju ključnu ulogu u održavanju normalne glomerularne funkcije (Fogo, 2011). Gubitak podocita izazvan apoptozom se obično dešava u patogenezi mnogih bolesti bubrega (Susztak i sar., 2006; Marshall i sar., 2010; Li i sar., 2013; Daehn i sar., 2014). RHO GTPaze imaju ključnu ulogu u održavanju strukture i funkcije podocita, putem regulacije aktinskog citoskeleta, mikrotubula, migracije i interakcije sa drugim strukturnim proteinima (Mouawad i sar., 2013).

RHOA i CDC42 pripadaju familiji malih RHO GTPaza i smatraju se glavnim regulatorima aktinske citoskeletne arhitekture i ćelijske adhezije. Međutim, ove RHO GTPaze takođe kontrolišu druge važne ćelijske funkcije, kao što su ekspresija gena, proliferacija i apoptoza (Etienne-Manneville i Hall, 2002). RHOA i CDC42 su identifikovani kao značajni faktori u patogenezi hronične bubrežne insuficijencije (Wang i sar., 2012; Reiser i Sever, 2013).

Pokazano je da CDC42 ima ključnu ulogu u održavanju ćelija podocita (Yanagida-Asanuma i sar., 2007), dok delecija ovog gena u podocitima dovodi do promena u morfologiji podocita i poremećaju glomerularne funkcije (Blattner i sar., 2013). Naši rezultati su pokazali da ne postoji razlika u nivou ekspresije iRNK *CDC42* u ćelijskoj liniji sa homozigotnim nokautom gena *MIR185* u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom. Pošto je na osnovu mreže interakcija najčešće lokalizovanih miRNK u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om i njihovih ciljnih gena, zaključeno da hsa-miR-185-5p reguliše ekspresiju *CDC42*, moguće je da translaciona represija doprinosi ovom rezultatu, što znači da hsa-miR-185-5p može da utiče na nivo proteina *CDC42*, dok nivo iRNK *CDC42* ostaje nepromenjen.

Ranije je opisano da je smanjenje ekspresije gena *RHOA*, efekat koji je primećen u ćelijskoj liniji sa homozigotnim nokautom gena *MIR185*, u podocitima doveo do povećane apoptoze (Huang i sar., 2016), procesa koji se obično povezuje sa razvojem bolesti bubrega (Canaud i sar., 2013). Familija RHO proteina ima centralnu ulogu u ćelijskim procesima, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i migraciju ćelija koji su od suštinskog značaja u embriogenezi (Olson i sar., 1995; Bianchi i sar., 2003). Istraživanja na miševima kojima nedostaje gen *RHO GDIa*, regulator članova familije RHO, pokazala su da izmenjena regulacija članova familije RHO utiče na razvoj bubrega (Togawa i sar., 1999). Štaviše, otkriveno je da je *RHOA* prisutna u bubrezima pacova i ljudi od vrlo ranih faza razvoja bubrega kada se javlja većina indukcionih procesa koji karakterišu organogenezu bubrega (Bianchi i sar., 2003).

Rezultati u okviru ove teze potvrđuju uticaj retkih CNV regiona na ekspresiju miRNK koje su lokalizovane u njima, što dalje utiče na ekspresiju ciljnih gena. Usled delecija gena za *MIR185* i *MIR484* došlo je do smanjenja nivoa hsa-miR-484 u ćelijskoj liniji sa heterozigotnim nokautom gena *MIR484*, a ekspresija hsa-miR-185-5p nije detektovana u ćelijskoj liniji sa homozigotnim nokautom gena *MIR185*, u odnosu na HEK293 WT ćelijsku liniju, čime je potvrđen efekat retkog CNV regiona na nivo ekspresije obe miRNK. Dodatno, smanjenje ekspresije ove dve miRNK rezultiralo je promenama u nivoima ekspresije *MDM2*, *APAF1*, *NOTCH3* i *RHOA* u nokaut ćelijskim linijama u odnosu na HEK293 WT ćelijsku liniju. Iako nije došlo do promene u ekspresiji svih gena, postoji mogućnost da je došlo do promena na nivou proteina putem mehanizma translacione represije. Ova složena regulacija na nivou translacije ističe sposobnost miRNK da menjaju nivo proteina i funkciju ciljnih gena, čak i ako se nivoi iRNK ne menjaju. Sve ovo naglašava kompleksnu prirodu interakcija miRNK i ciljnih gena, pri čemu su dodatna istraživanja neophodna kako bi se potvrdila ova hipoteza i razjasnili mehanizmi koji stoje iza ove regulacije.

5.5. Efekat restitucije nivoa hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p na ekspresiju ciljnih gena

Kako bi ispitali translacioni potencijal hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p, *in vitro* su tretirane sve tri ćelijske linije odgovarajućim miRNK mimikama. Primećeno je da su miRNK mimike kojima je tretirana HEK293 WT ćelijska linija, imale efekat na ekspresiju većeg broja ciljnih gena u poređenju sa tretmanom obe nokaut ćelijske linije.

Tretman odgovarajućih nokaut ćelijskih linija sa miRNK mimikama nije pokazao značajan efekat na nivo *MDM2* i *FIS1* transkripata u poređenju sa kontrolnim tretmanom. Međutim, tretman HEK293 WT ćelijske linije sa mimikom hsa-miR-185-5p je rezultirao značajnim smanjenjem nivoa *MDM2* transkripta u poređenju sa kontrolnim tretmanom. Slično tome, tretman mimikom hsa-miR-484 pokazao je trend smanjenja nivoa ekspresije iRNK *MDM2* u poređenju sa kontrolnim tretmanom. Takođe, primetili smo značajno povećanje nivoa *FIS1* transkripta, kada je HEK293 WT ćelijska linija tretirana mimikom hsa-miR-484. Ne treba isključiti da određene promene u nivou *MDM2* mogu biti efekat p53 statusa ćelija HEK293. Međutim, primećeno je da prezasićenost p53 u ćelijama HEK293 sprečava značajnu promenu aktivnosti *MDM2* čak i tokom transfekcije p53 (Löber i sar., 2002). Zbog toga, čak i ako dođe do promena u nivoima p53, ne očekuje se da bi uočene promene u ekspresiji *MDM2* mogle biti izazvane promenama u nivou p53.

Kao što je primećeno i u našim i u drugim studijama, gen *MDM2* je regulisan sa više miRNK koje su povezane sa različitim patologijama (Hoffman i sar., 2014; Ren i sar., 2014; Zhou i sar., 2019). Zbog toga bi u budućim istraživačkim strategijama trebalo razmotriti i alternativne miRNK, koje nisu obuhvaćene u ovom eksperimentu, a koje imaju iste ciljne gene. Razmatranje upotrebe kombinacije miRNK može rezultirati postizanjem maksimalnog kompenzacionog efekta za deleciju gena koji kodira specifičnu miRNK zbog potencijalne mreže kompetirajućih endogenih RNK (engl. *competing endogenous RNA* – ceRNA).

Jedan od mogućih mehanizama koji može da objasni zašto tretman HEK293 WT ćelijske linije miRNK mimikama ima efekat na ekspresiju većeg broja ciljnih gena u poređenju sa tretmanom obe nokaut ćelijske linije leži u hipotezi o kompetirajućim endogenim RNK. Prema ceRNA hipotezi, određene RNK, koje sadrže MRE sekvence mogu delovati kao mamci za miRNK, što znači da ove RNK mogu privući miRNK i sprečiti ih da regulišu druge ciljne RNK molekule. Na primer, pseudogeni, koji su segmenti DNK koji podsećaju na gene koji kodiraju proteine, ali su nefunkcionalni, mogu delovati kao kompetitivne endogene RNK, privlačeći miRNK i konkurišući za vezivanje, čime utiču na nivo ekspresije gena. Osim pseudogena, i drugi RNK molekuli, poput dugih nekodirajućih RNK mogu ometati aktivnost miRNK, na taj način modulišući ekspresiju gena. Eksperimentalni dokazi postoje da su egzogeno ekspimirani miRNK mamci u stanju da efikasno i specifično inhibiraju funkciju miRNK (Ebert i sar., 2007; Brown i sar., 2007; Gentner i sar., 2009). Ova dinamična interakcija miRNK i različitih kompetirajućih endogenih RNK, otvara nove perspektive u razumevanju regulacije gena, gde se MRE sekvence mogu posmatrati kao slova „RNK jezika”, putem kojeg transkripti aktivno komuniciraju radi regulacije svoje ekspresije (Salmena i sar., 2011). Snažna podrška ceRNA hipotezi dolazi iz činjenice da efikasnost miRNK zavisi od koncentracije njenih ciljnih gena (Arvey i sar., 2010). miRNK koje imaju veći broj ciljnih gena mogu da regulišu svaki ciljni gen u manjoj meri od miRNK sa manje ciljnih gena. Po istom principu, kada je nivo određene iRNK povećan, miRNK represija je znatno manja jer ukupan broj MRE premašuje broj samih miRNK. Zbog toga, promena nivoa pojedinačne endogeno kompetirajuće RNK ima uticaj na druge RNK sa kojima deli MRE. Takođe, karakterizacija ceRNA mreže može otkriti regulatorne mreže koje se ne mogu uočiti konvencionalnim metodama. Ovo je posebno važno u kontekstu proučavanja bolesti, jer poremećaji u ceRNA mrežama mogu imati implikacije na razvoj bolesti, ali istovremeno otvaraju i nove puteve za terapijske intervencije.

Sve je više dokaza koji opisuju endogene mamce, koji kompetitivno regulišu distribuciju miRNK molekula na njihove ciljne gene za obe, hsa-miR-484 (Xie i sar., 2018; Li i sar., 2020; Zhang i sar., 2021) i hsa-miR-185-5p (Wu i sar., 2019; Yu i sar., 2021; Niu i sar., 2023;).

Uzimajući u obzir prethodno opisani mehanizam, uočeni efekti značajnije aktivnosti miRNK mimika koje su transfekcijom uvedene u HEK293 WT ćelijsku liniju mogu biti posledica zasićenijih mamaca koji omogućavaju dalje interakcije mimika sa njihovim ciljnim transkriptima. Suprotno tome, nokaut sistem koji ima potencijalno slobodne MRE i na iRNK ciljnih gena i na nekodirajućim mamcima, mogao bi biti manje sklon aktivnosti miRNK mimika. Stoga bi buduće studije trebalo da razmotre integrisanu evaluaciju višeslojne regulatorne mreže koja obuhvata miRNK, duge nekodirajuće RNK i kodirajuće transkripte kako bi se predvideli potencijalni mehanizmi sa translacionim potencijalom za terapijsku primenu. Pored toga, ove informacije predstavljaju dragocenu smernicu za buduće strategije personalizovanog lečenja CAKUT-a.

U istraživanim postavkama ove studije, najveći efekat je primećen za hsa-miR-185-5p/RHOA osu. Dok je nokaut gena *MIR185* asociran sa smanjenjem nivoa iRNK *RHOA*, tretman ćelijske linije sa homozigotnim nokautom gena *MIR185* sa mimikom hsa-miR-185-5p doveo je do restitucije ekspresije *RHOA*. Međutim, treba napomenuti da uočeni efekat ne oslikava kanonsku aktivnost inhibitorne regulacije ekspresije gena miRNK. Mada, nije neuobičajeno da miRNK takođe može delovati in-trans tako što povećavaju ekspresiju ciljnih gena u zavisnosti od tipa tkiva i stanja (Valinezhad i sar., 2014). Na primer, *MIR145* učestvuje u regulaciji miokardina tokom diferencijacije mišića tako što povećava njegovu ekspresiju (Cordes i sar., 2009), dok ista miRNK indukuje smanjenje ekspresije *ROCK1* kod osteosarkoma (Li i sar., 2014). Pored toga, ranije je pokazano da inhibitor hsa-miR-185 značajno povećava ekspresiju *DNMT1* u ćelijskoj liniji *HK2* i modulacijom ekspresije *DNMT1* reguliše ekspresiju *MEG3* u bubrežnoj fibrozi izazvanoj *TGF-b1* (Xue i sar., 2019). U našem eksperimentu, gde je uvedena delecija gena *MIR185* u ćelijskoj liniji *HEK293*, *DNMT1* bi takođe mogao da bude povećano ekspimiran i da naknadno utiče na određene gene kao što je *RHOA*. Stoga bi buduće studije trebalo da istraže ovde predstavljenu interakciju hsa-miR-185-5p/RHOA u CAKUT-u i progresiju bubrežne insuficijencije kod pacijenata sa delecijom

gena *MIR185*, dok bi targetiranje ose hsa-miR-185-5p/RHOA kod pacijenata sa CAKUT-om kod kojih je prisutna delecija *MIR185* moglo potencijalno imati terapijske koristi.

Tretman sa odgovarajućim hsa-miR-185-5p miRNK mimikom obe, HEK293 *MIR185* KO^{hom} i HEK293 WT ćelijskih linija je doveo do značajnog povećanja nivoa ekspresije iRNK *ATF6*, što je bilo neočekivano. Bioinformatičko određivanje ciljnih gena miRNK je pokazalo da je pretpostavljeno mesto vezivanja za hsa-miR-185-5p bilo prisutno u 3'UTR regionu *ATF6*, a prethodno je u HK2 ćelijama koje su bile izložene TGF/beta1 potvrđena smanjena regulacija *ATF6* posredovana hsa-miR-185-5p (Yuan i sar., 2020). Da li je do uočenih neslaganja došlo zbog razlike u ćelijskim linijama koje su korišćene u studijama ili zbog razlika u tretmanu (TGF beta tretman i fibroza), ostaje da se potvrdi u budućnosti.

Dodatno smo primetili da nakon tretmana HEK293 *MIR484* KO^{het} i HEK293 WT ćelijskih linija, mimikom hsa-miR-484, takođe dolazi do značajnog smanjenja *NOTCH3* u poređenju sa kontrolnim tretmanom. Tako bi uočena smanjena ekspresija *NOTCH3* u HEK293 *MIR484* KO^{het} u poređenju sa ćelijskom linijom HEK293 WT mogla biti fenomen koji opisuje leziju DNK kao okidač za odgovor transkripcione adaptacije (El-Brolosy i Stainier, 2017) koji bi mogao vratiti očekivani efekat fenotipa. Fenomen lezije DNK se javlja nakon oštećenja DNK, kada dolazi do globalne reorganizacije i dekondezacije hromatina (Takahashi i Kaneko, 1985; Ziv i sar., 2006). Ovi procesi su posredovani sa nekoliko remodelatora hromatina i enzima koji modifikuju histone (Downs i sar., 2007). Reorganizacija hromatina može rezultirati promenama u petljama DNK i organizaciji nukleusa (Chambeyron i Bickmore, 2004), što takođe može uticati na ekspresiju gena, tako što će doći do povećanja dostupnosti hromatina u regulatornim regionima gena koji kompenzuju oštećenja. Ova istraživanja ukazuju da regulacija može biti neočekivano dinamična. Dok precizan mehanizam smanjenja ekspresije *NOTCH3* nakon transfekcije hsa-miR-484 tek treba da se utvrdi, naši rezultati imaju potencijalno važan uticaj na upotrebu hsa-miR-484 u stabilizaciji pojačano eksprimiranog *NOTCH3* koji je povezan sa fenotipovima CAKUT-a.

Na osnovu rezultata ove studije, nismo uočili značajne razlike u nivou ekspresije gena *APAF1*, *CDC42* i *PKD1* u ćelijama koje su tretirane odgovarajućim miRNK mimikama u poređenju sa ćelijama koje su tretirane NT miRNK kontrolom, što potencijalno može biti rezultat aktivacije kompenzacionih mehanizama ili gena. Oni mogu delovati na način da neutrališu efekte miRNK mimike na ekspresiju ciljnih gena. Ova kompenzacija može biti posledica regulatornih mehanizama unutar ćelija, koji se aktiviraju kao odgovor na promene u ekspresiji gena. Takođe, kompenzacija može biti posledica delovanja drugih miRNK, dugih nekodirajućih RNK (engl. *long non-coding RNA* – lncRNA) ili transkripcionih faktora koji se mogu aktivirati kao odgovor na tretman miRNK mimikama, kako bi se održala homeostaza i normalna funkcija ćelija.

Ograničenja ove studije obuhvataju nedostatak direktnog praćenja nivoa proteina ciljnih gena, imajući u vidu da miRNK, osim što utiču na degradaciju ciljne iRNK, takođe mogu da regulišu ekspresiju ciljnih gena putem mehanizma translacione represije. Pošto u ovoj studiji nije potvrđena interakcija između miRNK i iRNK ciljnih gena, buduća istraživanja bi trebalo da ispituju da li su promene u ekspresiji ciljnih gena direktan ili indirektan efekat hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p. Takođe, studija se oslanja na *in vitro* modele koji ne oslikavaju kompleksnost interakcija unutar celokupnog organizma. Kako bismo bolje razumeli mehanizme koji stoje iza ove regulacije i prevazišli ograničenja ove studije, potrebno je proširiti istraživanje integrativnim studijama koje uključuju i dinamiku hromatina, kompenzacione efekte i interakcije miRNK-iRNK-lncRNA i nivoa proteina. Aktivacija ili utišavanje gena za miRNK u *in vivo* modelima će takođe pružiti značajan uvid u mehanizam miRNK regulacije koje su lokalizovane u CNV regionima. Pored toga, korelacija između miRNK koje su lokalizovane u CNV regionima i ekspresije odgovarajućih ciljnih gena treba istražiti *ex vivo* kako bi se procenio efekat u kontekstu kompenzacionih mehanizama. Štaviše, u budućim studijama bi trebalo razmotriti tretman sa prethodno formiranim kompleksima miRNK-Argonaut protein (Castellanos-Gonzalez i sar., 2016), jer je opisano da količina slobodnog Argonaut

proteina može da ograniči funkcionalni efekat miRNK koje su transfekcijom uvedene u ćeliju (Thomson i sar., 2013). Izmenjena regulacija brojnih iRNK ciljnih gena, koja je posredovana miRNK koje su lokalizovane u CNV regionima može dovesti do varijabilnosti fenotipa CAKUT-a.

Iako *in vitro* modeli predstavljaju polaznu osnovu za izučavanje kompleksne molekularno genetičke osnove CAKUT-a, primenjeni modeli i metodološki pristup korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji nam omogućavaju da dobijemo bolji uvid u ovu problematiku. Ovakav pristup nije samo koristan za razumevanje CAKUT-a, već otvara i mogućnosti za primenu u proučavanju drugih složenih bolesti. Funkcionalna osa koja uključuje retke CNV regione koji su asocirani sa CAKUT-om i naknadna izmenjena aktivnost hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p usled njihove promene u ekspresiji ukazuje na translacioni potencijal ovih miRNK za moguću primenu u preciznoj medicini. Njihova regulacija ciljnih gena može se iskoristiti za razvoj terapijskih strategija koje ciljaju specifične molekularne puteve u CAKUT-u. Kroz razumevanje translacionog potencijala ovih miRNK i integraciju tih saznanja u kliničku praksu, moguće je personalizovati lečenje i izmeniti ishod bolesti kod pacijenata sa CAKUT-om.

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Primenom algoritma koji je predstavljen u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se uspešno identifikovati i funkcionalno interpretirati geni za miRNK koji su najčešće lokalizovani u retkim CNV regionima koji su asocirani sa CAKUT-om.
2. Generisani modeli ćelijskih linija sa nokautom za gene miRNK se mogu se uspešno primeniti u studijama, sa ciljem izučavanja efekta CNV regiona na ekspresiju gena za miRNK koji su lokalizovani u njima, kao i posledične promene u ekspresiji gena koji su targeti nokautiranih miRNK.
3. Uvedena heterozigotna delecija gena za *MIR484* u HEK293 ćelijskoj liniji ima efekat na ekspresiju hsa-miR-484 koja je značajno niža u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom. Uvedena homozigotna delecija gena za *MIR185* u HEK293 ćelijskoj liniji ima efekat na ekspresiju hsa-miR-185-5p koja nije detektovana ovoj ćelijskoj liniji u poređenju sa HEK293 WT ćelijskom linijom gde je ekspresija ove miRNK identifikovana. Na osnovu ovih rezultata zaključujemo da CNV regioni imaju funkcionalni efekat na ekspresiju miRNK gena koji su u njima lokalizovani.
4. Promena nivoa hsa-miR-484 usled heterozigotne delecije je povezana sa promenom u ekspresiji *MDM2*, *APAF1* i *NOTCH3*, dok je promena nivoa hsa-miR-185-5p usled homozigotne delecije povezana sa promenom u ekspresiji *MDM2* i *RHOA*. Ove promene potvrđuju značaj miRNK i uticaj delecije gena za ove miRNK na regulaciju ciljnih gena, na osnovu čega zaključujemo da CNV regioni imaju efekat ne samo na ekspresiju miRNK gena koji su u njima lokalizovani, već i na ekspresiju njihovih ciljnih gena.
5. Restitucijom nivoa hsa-miR-484 i hsa-miR-185-5p u ćelijskim linijama sa uvedenom homozigotnom ili heterozigotnom delecijom gena za ove miRNK, potvrđen je potencijal ublažavanja efekta retkog CNV regiona na ekspresiju ciljnih gena miRNK koje su lokalizovane u ovim regionima, što nam ukazuje na mogućnost korišćenja miRNK mimika ili drugih oblika miRNK terapije kao strategije za ponovno uspostavljanje izmenjene ekspresije određenih analiziranih gena koja je uzrokovana izmenjenom ekspresijom miRNK koja je lokalizovana u retkom CNV regionu.
6. Primenjeni modeli i metodološki pristup korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji nam omogućavaju da dobijemo bolji uvid u molekularno genetičku osnovu CAKUT-a. S obzirom na uspešnost ovog pristupa, mogao bi se primeniti i za rasvetljavanje molekularno genetičke osnove drugih složenih bolesti.

7. Literatura

Abdelhak, Sonia, et al. "A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family." *Nature genetics* 15.2 (1997): 157-164.

Aboudehen, Karam, et al. "Mechanisms of p53 activation and physiological relevance in the developing kidney." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 302.8 (2012): F928-F940.

Ahn, Yo Han, et al. "Targeted exome sequencing provided comprehensive genetic diagnosis of congenital anomalies of the kidney and urinary tract." *Journal of Clinical Medicine* 9.3 (2020): 751.

Alirol, Emilie, et al. "The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis." *Molecular biology of the cell* 17.11 (2006): 4593-4605.

Alkan, Can, Bradley P. Coe, and Evan E. Eichler. "Genome structural variation discovery and genotyping." *Nature reviews genetics* 12.5 (2011): 363-376.

Alpers, Charles E., et al. "Developmental patterns of PDGF B-chain, PDGF-receptor, and α -actin expression in human glomerulogenesis." *Kidney international* 42.2 (1992): 390-399.

Anders, Simon, and Wolfgang Huber. "Differential expression analysis for sequence count data." *Nature Precedings* (2010): 1-1.

Aparicio-Puerta, Ernesto, et al. "mirnaQC: a webserver for comparative quality control of miRNA-seq data." *Nucleic acids research* 48.W1 (2020): W262-W267.

Aparicio-Puerta, Ernesto, et al. "sRNAbench and sRNAtoolbox 2022 update: accurate miRNA and snRNA profiling for model and non-model organisms." *Nucleic acids research* 50.W1 (2022): W710-W717.

Armand-Labit, Virginie, et al. "Identification of a circulating microRNA profile as a biomarker of metastatic cutaneous melanoma." *Acta dermato-venereologica* 96.1 (2016): 29-34.

Artavanis-Tsakonas, Spyros, Matthew D. Rand, and Robert J. Lake. "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* 284.5415 (1999): 770-776.

Arvey, Aaron, et al. "Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity." *Molecular systems biology* 6.1 (2010): 363.

Barasch, Jonathan, et al. "Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF." *Cell* 99.4 (1999): 377-386.

Barasch, Jonathan, et al. "Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros." *The Journal of clinical investigation* 103.9 (1999): 1299-1307.

Bartram, Malte P., et al. "Conditional loss of kidney microRNAs results in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)." *Journal of Molecular Medicine* 91 (2013): 739-748.

Baumgart, Mario, et al. "A miRNA catalogue and ncRNA annotation of the short-living fish *Nothobranchius furzeri*." *BMC genomics* 18 (2017): 1-12.

Beg, Muhammad S., et al. "Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors." *Investigational new drugs* 35 (2017): 180-188.

Bernardini, Nunzia, et al. "Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor, transforming growth factor α , and their receptor in the human mesonephros and metanephros." *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 206.3 (1996): 231-238.

Bianchi, Francesco, et al. "Cellular and subcellular localization of the small G protein RhoA in the human and rat embryonic and adult kidney." *acta histochemica* 105.1 (2003): 89-97.

Blake, Joshua, and Norman D. Rosenblum. "Renal branching morphogenesis: morphogenetic and signaling mechanisms." *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 36. Academic Press, 2014.

Blattner, Simone M., et al. "Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury." *Kidney international* 84.5 (2013): 920-930.

Bond, Gareth L., Wenwei Hu, and Arnold J. Levine. "MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting." *Current cancer drug targets* 5.1 (2005): 3-8.

Boone, Philip M., et al. "Detection of clinically relevant exonic copy-number changes by array CGH." *Human mutation* 31.12 (2010): 1326-1342.

Boulos, Nada, et al. "Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone." *Hypertension* 57.6 (2011): 1176-1182.

Brophy, Patrick D., et al. "Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene." (2001): 4747-4756.

Broughton, James P., et al. "Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity." *Molecular cell* 64.2 (2016): 320-333.

Brown, Brian D., et al. "A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 110.13 (2007): 4144-4152.

Cacalano, Grace, et al. "GFR α 1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." *Neuron* 21.1 (1998): 53-62.

Cacialli, Pietro, et al. "Morpho-Functional Features of the Gonads of Danio rerio: the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor." *The Anatomical Record* 301.1 (2018): 140-147.

Cacialli, Pietro. "Expression of Nerve Growth Factor and Its Receptor TrkA in the Reproductive System of Adult Zebrafish." *Veterinary Sciences* 9.5 (2022): 225.

Cai, Meiyang, et al. "Detection of copy number disorders associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract in fetuses via single nucleotide polymorphism arrays." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 34.1 (2020): e23025.

Canaud, Guillaume, et al. "AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease." *Nature medicine* 19.10 (2013): 1288-1296.

Capone, Valentina P., et al. "Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract: the current state of play." *International journal of molecular sciences* 18.4 (2017): 796.

Carev, Dominko, Marijan Saraga, and Mirna Saraga-Babic. "Expression of intermediate filaments, EGF and TGF- α in early human kidney development." *Journal of molecular histology* 39 (2008): 227-235.

Caruana, Georgina, et al. "Copy-number variation associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract." *Pediatric nephrology* 30 (2015): 487-495.

Carvalho, Claudia MB, and James R. Lupski. "Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders." *Nature Reviews Genetics* 17.4 (2016): 224-238.

Castellanos-Gonzalez, Alejandro, et al. "Preassembled single-stranded RNA–argonaute complexes: a novel method to silence genes in *Cryptosporidium*." *The Journal of infectious diseases* 213.8 (2016): 1307-1314.

Chambeyron, Séverine, and Wendy A. Bickmore. "Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription." *Genes & development* 18.10 (2004): 1119-1130.

Chang, Le, et al. "miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology." *Nucleic acids research* 48.W1 (2020): W244-W251.

Chesnaye, Nicholas, et al. "Demographics of paediatric renal replacement therapy in Europe: a report of the ESPN/ERA–EDTA registry." *Pediatric nephrology* 29 (2014): 2403-2410.

Chiang, Chih-Kang, et al. "Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis." *Molecular medicine* 17 (2011): 1295-1305.

Chiang, Colby, et al. "The impact of structural variation on human gene expression." *Nature genetics* 49.5 (2017): 692-699.

Christofides, Andrea, et al. "Evidence for miR-548c-5p regulation of FOXC2 transcription through a distal genomic target site in human podocytes." *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (2020): 2441-2459.

Chung, Eunah, et al. "Notch signaling promotes nephrogenesis by downregulating Six2." *Development* 143.21 (2016): 3907-3913.

Chung, Ki Wung, et al. "Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis." *Cell metabolism* 30.4 (2019): 784-799.

Clark, Amander T., and John F. Bertram. "Molecular regulation of nephron endowment." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 276.4 (1999): F485-F497.

Cordes, Kimberly R., et al. "miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity." *Nature* 460.7256 (2009): 705-710.

Daehn, Ilse, et al. "Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis." *The Journal of clinical investigation* 124.4 (2014): 1608-1621.

De Girolamo, Paolo, et al. "TRK neurotrophin receptor-like proteins in the kidney of frog (*Rana esculenta*) and lizard (*Podarcis sicula*): an immunohistochemical study." *Anatomy and Embryology* 207 (2004): 481-487.

Detmer, Scott A., and David C. Chan. "Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics." *Nature reviews Molecular cell biology* 8.11 (2007): 870-879.

Diener, Caroline, et al. "Quantitative and time-resolved miRNA pattern of early human T cell activation." *Nucleic Acids Research* 48.18 (2020): 10164-10183.

Dionne, Lai Kuan, et al. "Centrosome amplification disrupts renal development and causes cystogenesis." *Journal of Cell Biology* 217.7 (2018): 2485-2501.

Djudjaj, Sonja, et al. "Notch-3 receptor activation drives inflammation and fibrosis following tubulointerstitial kidney injury." *The Journal of pathology* 228.3 (2012): 286-299.

Djuric, Tamara, et al. "MMP-1 and-3 haplotype is associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract." *Pediatric nephrology* 29 (2014): 879-884.

- Downs, Jessica A., Michel C. Nussenzweig, and André Nussenzweig. "Chromatin dynamics and the preservation of genetic information." *Nature* 447.7147 (2007): 951-958.
- Dressler, Gregory R. "The cellular basis of kidney development." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22 (2006): 509-529.
- Ebert, Margaret S., Joel R. Neilson, and Phillip A. Sharp. "MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells." *Nature methods* 4.9 (2007): 721-726.
- El Machhour, Fala, et al. "Activation of Notch3 in glomeruli promotes the development of rapidly progressive renal disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 26.7 (2015): 1561-1575.
- El-Brolosy, Mohamed A., and Didier YR Stainier. "Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms." *PLoS genetics* 13.7 (2017): e1006780.
- Eremina, Vera, et al. "Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases." *The Journal of clinical investigation* 111.5 (2003): 707-716.
- Esquela, Aurora F., and Se-Jin Lee. "Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11." *Developmental biology* 257.2 (2003): 356-370.
- Etienne-Manneville, Sandrine, and Alan Hall. "Rho GTPases in cell biology." *Nature* 420.6916 (2002): 629-635.
- Fareh, Mohamed, et al. "TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments." *Nature communications* 7.1 (2016): 13694.
- Fedou, Camille, et al. "The low affinity p75 neurotrophin receptor is down-regulated in congenital anomalies of the kidney and the urinary tract: Possible involvement in early nephrogenesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 533.4 (2020): 786-791.
- Ferraro, Elisabetta, et al. "Apaf1 plays a pro-survival role by regulating centrosome morphology and function." *Journal of Cell Science* 124.20 (2011): 3450-3463.
- Feuk, Lars, Andrew R. Carson, and Stephen W. Scherer. "Structural variation in the human genome." *Nature Reviews Genetics* 7.2 (2006): 85-97.
- Fogo, Agnes B. "The targeted podocyte." *The Journal of clinical investigation* 121.6 (2011): 2142-2145.
- Friedman, Jeffrey M., and Peter A. Jones. "MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease." *Swiss medical weekly* 139.33-34 (2009): 466.
- Gallant-Behm, Corrie L., et al. "A microRNA-29 mimic (Remlarsen) represses extracellular matrix expression and fibroplasia in the skin." *Journal of Investigative Dermatology* 139.5 (2019): 1073-1081.
- Gatsiou, Aikaterini, et al. "Additive contribution of microRNA-34a/b/c to human arterial ageing and atherosclerosis." *Atherosclerosis* 327 (2021): 49-58.
- Gatta, Claudia, et al. "Brain derived neurotrophic factor in the retina of the teleost *N. furzeri*." *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 196.4 (2014): 192-196.
- Gebert, Luca FR, and Ian J. MacRae. "Regulation of microRNA function in animals." *Nature reviews Molecular cell biology* 20.1 (2019): 21-37.
- Gentner, Bernhard, et al. "Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors." *Nature methods* 6.1 (2009): 63-66.

- Germana, Antonino, et al. "Expression and localization of BDNF/TrkB system in the zebrafish inner ear." *International Journal of Molecular Sciences* 21.16 (2020): 5787.
- Ghisi, Margherita, et al. "Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 117.26 (2011): 7053-7062.
- Giamogante, Flavia, et al. "Apoptotic signals at the endoplasmic reticulum-mitochondria interface." *Advances in protein chemistry and structural biology* 126 (2021): 307-343.
- Girirajan, Santhosh, Catarina D. Campbell, and Evan E. Eichler. "Human copy number variation and complex genetic disease." *Annual review of genetics* 45 (2011): 203-226.
- Gomes, Ligia C., and Luca Scorrano. "High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1777.7-8 (2008): 860-866.
- Griffin, Matthew D., et al. "Vascular expression of polycystin." *Journal of the American Society of Nephrology* 8.4 (1997): 616-626.
- Grote, David, et al. "Gata3 acts downstream of β -catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction." *PLoS genetics* 4.12 (2008): e1000316.
- Ha, Minju, and V. Narry Kim. "Regulation of microRNA biogenesis." *Nature reviews Molecular cell biology* 15.8 (2014): 509-524.
- Hahn, Won-Ho, Jin-Soon Suh, and Byoung-Soo Cho. "Linkage and association study of neurotrophins and their receptors as novel susceptibility genes for childhood IgA nephropathy." *Pediatric research* 69.4 (2011): 299-305.
- Hastings, Philip J., et al. "Mechanisms of change in gene copy number." *Nature Reviews Genetics* 10.8 (2009): 551-564.
- Hatini, Victor, et al. "Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2." *Genes & development* 10.12 (1996): 1467-1478.
- Hausmann, George, et al. "Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-xL." *The Journal of cell biology* 149.3 (2000): 623-634.
- Heidet, Laurence, et al. "Spectrum of HNF1B mutations in a large cohort of patients who harbor renal diseases." *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 5.6 (2010): 1079.
- Hiraoka, Masahiro, et al. "Renal aplasia is the predominant cause of congenital solitary kidneys." *Kidney international* 61.5 (2002): 1840-1844.
- Hoffman, Yonit, et al. "miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53." *Cell Death & Differentiation* 21.2 (2014): 302-309.
- Hoppins, Suzanne, and Jodi Nunnari. "Mitochondrial dynamics and apoptosis—the ER connection." *Science* 337.6098 (2012): 1052-1054.
- Huang, Mei, et al. "The TGF β -ERK pathway contributes to Notch3 upregulation in the renal tubular epithelial cells of patients with obstructive nephropathy." *Cellular Signalling* 51 (2018): 139-151.
- Huang, Weili. "MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics." *Bioinformatics in MicroRNA research* (2017): 57-67.

Huang, Zongshun, et al. "RhoA deficiency disrupts podocyte cytoskeleton and induces podocyte apoptosis by inhibiting YAP/dendrin signal." *BMC nephrology* 17 (2016): 1-12.

Huber, L. Julie, Barbara Hempstead, and Michael J. Donovan. "Neurotrophin and neurotrophin receptors in human fetal kidney." *Developmental biology* 179.2 (1996): 369-381.

Hughes, Jim, et al. "The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains." *Nature genetics* 10.2 (1995): 151-160.

Idowu, Jessica, et al. "Aberrant regulation of Notch3 signaling pathway in polycystic kidney disease." *Scientific reports* 8.1 (2018): 3340.

Ihenacho, Ugochukwu Kelvin, et al. "Mitochondrial fission protein 1: emerging roles in organellar form and function in health and disease." *Frontiers in Endocrinology* 12 (2021): 660095.

Iwakawa, Hiro-oki, and Yukihide Tomari. "Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex." *Molecular cell* 82.1 (2022): 30-43.

Iwasawa, Ryota, et al. "Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction." *The EMBO journal* 30.3 (2011): 556-568.

Jacquet, Karine, et al. "New technologies for improved relevance in miRNA research." *Trends in Genetics* 37.12 (2021): 1060-1063.

Jain, Sanjay, and Feng Chen. "Developmental pathology of congenital kidney and urinary tract anomalies." *Clinical Kidney Journal* 12.3 (2019): 382-399.

James, Richard G., et al. "Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells." (2006): 2995-3004.

Jo, Myung Hyun, et al. "Human Argonaute 2 has diverse reaction pathways on target RNAs." *Molecular cell* 59.1 (2015): 117-124.

Johansson, Malin, et al. "New aspects concerning ulcerative colitis and colonic carcinoma: Analysis of levels of neuropeptides, neurotrophins, and TNFalpha/TNFreceptor in plasma and mucosa in parallel with histological evaluation of the intestine." *Inflammatory bowel diseases* 14.10 (2008): 1331-1340.

Jonas, Stefanie, and Elisa Izaurralde. "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing." *Nature reviews genetics* 16.7 (2015): 421-433.

Jovanović, Ivan, et al. "Transcriptome-driven integrative exploration of functional state of ureter tissue affected by CAKUT." *Life sciences* 212 (2018): 1-8.

Jovanović, Ivan, et al. "Transcriptome-wide based identification of miRs in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in children: the significant upregulation of tissue miR-144 expression." *Journal of Translational Medicine* 14.1 (2016): 1-10.

Kajbafzadeh, Abdol-Mohammad, et al. "Smooth muscle cell apoptosis and defective neural development in congenital ureteropelvic junction obstruction." *The Journal of urology* 176.2 (2006): 718-723.

Kang, Wei, et al. "NOTCH3, a crucial target of miR-491-5p/miR-875-5p, promotes gastric carcinogenesis by upregulating PHLDB2 expression and activating Akt pathway." *Oncogene* 40.9 (2021): 1578-1594.

Karavanov, A., et al. "Neurotrophin 3 rescues neuronal precursors from apoptosis and promotes neuronal differentiation in the embryonic metanephric kidney." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.24 (1995): 11279-11283.

Karihaloo, Anil, et al. "Hepatocyte growth factor-mediated renal epithelial branching morphogenesis is regulated by glypican-4 expression." *Molecular and Cellular Biology* 24.19 (2004): 8745-8752.

Karumanchi, S. Ananth, et al. "Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors." *Molecular cell* 7.4 (2001): 811-822.

Kerecuk, Larissa, et al. "Autosomal dominant inheritance of non-syndromic renal hypoplasia and dysplasia: dramatic variation in clinical severity in a single kindred." *Nephrology Dialysis Transplantation* 22.1 (2007): 259-263.

Kern, Fabian, et al. "What's the target: understanding two decades of in silico microRNA-target prediction." *Briefings in bioinformatics* 21.6 (2020): 1999-2010.

Khan, Kamal, et al. "Multidisciplinary approaches for elucidating genetics and molecular pathogenesis of urinary tract malformations." *Kidney international* 101.3 (2022): 473-484.

Khan, Sanna, et al. "MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer." *Biochimie* 167 (2019): 12-24.

Kim, Ho-Shik, et al. "Identification of novel Wilms' tumor suppressor gene target genes implicated in kidney development." *Journal of biological chemistry* 282.22 (2007): 16278-16287.

Kim, Keetae, et al. "Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.4 (2000): 1731-1736.

Kostić, Mirjana, et al. "ACE and AT1 receptor gene polymorphisms and renal scarring in urinary bladder dysfunction." *Pediatric Nephrology* 19 (2004): 853-857.

Kumaran, Mahalakshmi, et al. "Breast cancer associated germline structural variants harboring small noncoding RNAs impact post-transcriptional gene regulation." *Scientific reports* 8.1 (2018): 7529.

Labbe, Katherine, Andrew Murley, and Jodi Nunnari. "Determinants and functions of mitochondrial behavior." *Annual review of cell and developmental biology* 30 (2014): 357-391.

Lai, Xin, Olaf Wolkenhauer, and Julio Vera. "Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling." *Nucleic acids research* 44.13 (2016): 6019-6035.

Lantinga-van Leeuwen, Irma S., et al. "Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice." *Human molecular genetics* 16.24 (2007): 3188-3196.

Lanzoni, Monica, et al. "European monitoring of congenital anomalies: JRC-EUROCAT report on statistical monitoring of congenital anomalies (2006–2015)." (2017).

Lau, Pick-Wei, et al. "The molecular architecture of human Dicer." *Nature structural & molecular biology* 19.4 (2012): 436-440.

Lee, Jennifer A., Claudia MB Carvalho, and James R. Lupski. "A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders." *cell* 131.7 (2007): 1235-1247.

Lee, Yang-ja, et al. "Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opal in apoptosis." *Molecular biology of the cell* 15.11 (2004): 5001-5011.

Lenna, Stefania, and Maria Trojanowska. "The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis." *Current opinion in rheumatology* 24.6 (2012): 663-668.

Leonhard, Wouter N., et al. "Scattered deletion of PKD1 in kidneys causes a cystic snowball effect and recapitulates polycystic kidney disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 26.6 (2015): 1322-1333.

Leonhard, Wouter N., Hester Happe, and Dorien JM Peters. "Variable cyst development in autosomal dominant polycystic kidney disease: the biologic context." *Journal of the American Society of Nephrology* 27.12 (2016): 3530-3538.

Li, Enqi, et al. "MiR-145 inhibits osteosarcoma cells proliferation and invasion by targeting ROCK1." *Tumor Biology* 35 (2014): 7645-7650.

Li, Nan, et al. "lncRNA THAP9-AS1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma growth and leads to a poor clinical outcome via sponging miR-484 and interacting with YAP." *Clinical Cancer Research* 26.7 (2020): 1736-1748.

Li, Ruizhao, et al. "NFAT2 mediates high glucose-induced glomerular podocyte apoptosis through increased Bax expression." *Experimental cell research* 319.7 (2013): 992-1000.

Lieber, Michael R. "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." *Annual review of biochemistry* 79 (2010): 181-211.

Lindner, Tom H., et al. "A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1 β ." *Human molecular genetics* 8.11 (1999): 2001-2008.

Liou, Yae-Huei, et al. "Hepatic Fis1 regulates mitochondrial integrated stress response and improves metabolic homeostasis." *JCI insight* 7.4 (2022).

Liu, Wanlu, Ling Feng, and Yuanyuan Wu. "The evaluation of genetic diagnosis on high-risk fetal CAKUT." *Frontiers in Genetics* 13 (2022): 869525.

Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method." *methods* 25.4 (2001): 402-408.

Löber, Christian, Claudia Lenz-Stöppler, and Matthias Dobbstein. "Adenovirus E1-transformed cells grow despite the continuous presence of transcriptionally active p53." *Journal of general virology* 83.8 (2002): 2047-2057.

Love, Michael I., Wolfgang Huber, and Simon Anders. "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome biology* 15 (2014): 1-21.

Ludikhuize, Marlies C., et al. "Mitochondria define intestinal stem cell differentiation downstream of a FOXO/Notch axis." *Cell metabolism* 32.5 (2020): 889-900.

Lupski, James R. "Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits." *Trends in genetics* 14.10 (1998): 417-422.

Lupski, James R. "Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution." *Environmental and molecular mutagenesis* 56.5 (2015): 419-436.

Macak, Natasa, et al. "Downregulation of fibrosis related hsa-miR-29c-3p in human CAKUT." *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 42.12 (2023): 945-958.

Madariaga, Leire, et al. "Severe prenatal renal anomalies associated with mutations in HNF1B or PAX2 genes." *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 8.7 (2013): 1179.

Maekawa, Hiroshi, et al. "Mitochondrial damage causes inflammation via cGAS-STING signaling in acute kidney injury." *Cell reports* 29.5 (2019): 1261-1273.

Mansoori, Behzad, et al. "miR-34a and miR-200c have an additive tumor-suppressive effect on breast cancer cells and patient prognosis." *Genes* 12.2 (2021): 267.

Marcinkowska, Malgorzata, et al. "Copy number variation of microRNA genes in the human genome." *BMC genomics* 12.1 (2011): 1-9.

Marose, Thomas D., et al. "β-catenin is necessary to keep cells of ureteric bud/Wolffian duct epithelium in a precursor state." *Developmental biology* 314.1 (2008): 112-126.

Marralle, Maurizio, et al. "Assessing the impact of copy number variants on miRNA genes in autism by Monte Carlo simulation." *PLoS One* 9.3 (2014): e90947.

Marshall, Caroline B., et al. "CDK inhibitor p21 is prosurvival in adriamycin-induced podocyte injury, in vitro and in vivo." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 298.5 (2010): F1140-F1151.

Martinez, Javier, et al. "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi." *Cell* 110.5 (2002): 563-574.

Martinez, Natalia J., and Albertha JM Walhout. "The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks." *Bioessays* 31.4 (2009): 435-445.

McCarroll, Steven A., et al. "Common deletion polymorphisms in the human genome." *Nature genetics* 38.1 (2006): 86-92.

McVey, Mitch, and Sang Eun Lee. "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings." *Trends in Genetics* 24.11 (2008): 529-538.

Medrano, Silvia, Maria Luisa S. Sequeira-Lopez, and R. Ariel Gomez. "Deletion of the miR-143/145 cluster leads to hydronephrosis in mice." *The American journal of pathology* 184.12 (2014): 3226-3238.

Meijer, Hedda A., Ewan M. Smith, and Martin Bushell. "Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?." *Biochemical Society Transactions* 42.4 (2014): 1135-1140.

Melo, Sonia A., and Manel Esteller. "Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer." *Seminars in cancer biology*. Vol. 27. Academic Press, 2014.

Mitra, Kasturi. "Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation." *Bioessays* 35.11 (2013): 955-964.

Mitrovic, Kristina, et al. "A preliminary study of the miRNA restitution effect on CNV-induced miRNA downregulation in CAKUT." *BMC genomics* 25.1 (2024): 218.

Mitrovic, Kristina, et al. "Identification and functional interpretation of miRNAs affected by rare CNVs in CAKUT." *Scientific Reports* 12.1 (2022): 17746.

Montessuit, Sylvie, et al. "Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization." *Cell* 142.6 (2010): 889-901.

Moore, Mark W., et al. "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." *Nature* 382.6586 (1996): 76-79.

Mouawad, Flaviana, Harmony Tsui, and Tomoko Takano. "Role of Rho-GTPases and their regulatory proteins in glomerular podocyte function." *Canadian journal of physiology and pharmacology* 91.10 (2013): 773-782.

Mukherjee, Malini, et al. "Notch signaling in kidney development, maintenance, and disease." *Biomolecules* 9.11 (2019): 692.

Mulay, Shrikant R., et al. "MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice." *Kidney international* 81.12 (2012): 1199-1211.

Mulay, Shrikant R., et al. "Murine double minute-2 inhibition ameliorates established crescentic glomerulonephritis." *The American journal of pathology* 186.6 (2016): 1442-1453.

Mulay, Shrikant R., et al. "Podocyte loss involves MDM2-driven mitotic catastrophe." *The Journal of pathology* 230.3 (2013): 322-335.

Murugapopathy, Vasikar, and Indra R. Gupta. "A primer on congenital anomalies of the kidneys and urinary tracts (CAKUT)." *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 15.5 (2020): 723.

Nakanishi, Koichi, William E. Sweeney Jr, and Ellis D. Avner. "Segment-specific c-ErbB2 expression in human autosomal recessive polycystic kidney disease." *Journal of the American Society of Nephrology* 12.2 (2001): 379-384.

Nakatochi, Masahiro, Itaru Kushima, and Norio Ozaki. "Implications of germline copy-number variations in psychiatric disorders: review of large-scale genetic studies." *Journal of Human Genetics* 66.1 (2021): 25-37.

Nicolaou, Nayia, et al. "Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT." *Nature Reviews Nephrology* 11.12 (2015): 720-731.

Nicolaou, Nayia, et al. "Prioritization and burden analysis of rare variants in 208 candidate genes suggest they do not play a major role in CAKUT." *Kidney international* 89.2 (2016): 476-486.

Nishimoto, Kaori, et al. "PAX2 gene mutation in a family with isolated renal hypoplasia." *Journal of the American Society of Nephrology* 12.8 (2001): 1769-1772.

Nishimura, Hideki, et al. "Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men." *Molecular cell* 3.1 (1999): 1-10.

Nishinakamura, Ryuichi, et al. "Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development." (2001): 3105-3115.

Niu, Zheli, et al. "Circ_0008529 contributes to renal tubular cell dysfunction in high glucose stress via miR-185-5p/SMAD2 pathway in Diabetic Nephropathy." *Biochemical Genetics* 61.3 (2023): 963-978.

Noland, Cameron L., and Jennifer A. Doudna. "Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways." *Rna* 19.5 (2013): 639-648.

Olson, Michael F., Alan Ashworth, and Alan Hall. "An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1." *Science* 269.5228 (1995): 1270-1272.

Padanilam, Babu J. "Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis." *American journal of physiology-Renal physiology* 284.4 (2003): F608-F627.

Perantoni, Alan O., Lee F. Dove, and Irina Karavanova. "Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.10 (1995): 4696-4700.

Pernas, Lena, and Luca Scorrano. "Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function." *Annual review of physiology* 78 (2016): 505-531.

Piriyapongsa, Jittima, and I. King Jordan. "A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements." *PloS one* 2.2 (2007): e203.

Pitera, Jolanta E., Peter J. Scambler, and Adrian S. Woolf. "Fras1, a basement membrane-associated protein mutated in Fraser syndrome, mediates both the initiation of the mammalian kidney and the integrity of renal glomeruli." *Human molecular genetics* 17.24 (2008): 3953-3964.

Pope IV, John C., et al. "How they begin and how they end: classic and new theories for the development and deterioration of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT." *Journal of the American Society of Nephrology* 10.9 (1999): 2018-2028.

Pritchard, Lynn, et al. "A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype." *Human molecular genetics* 9.18 (2000): 2617-2627.

Qiao, Ying, et al. "miRNA and miRNA target genes in copy number variations occurring in individuals with intellectual disability." *BMC genomics* 14 (2013): 1-10.

Ramayani, O. R., et al. "Prevalence of recurrent urinary tract infection in children with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol. 125. No. 1. IOP Publishing, 2018.

Redon, Richard, et al. "Global variation in copy number in the human genome." *nature* 444.7118 (2006): 444-454.

Reid, Glen, et al. "Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer." *Epigenomics* 8.8 (2016): 1079-1085.

Reiser, Jochen, and Sanja Sever. "Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease." *Annual review of medicine* 64 (2013): 357-366.

Ren, Z. J., et al. "Mir-509-5p joins the Mdm2/p53 feedback loop and regulates cancer cell growth." *Cell death & disease* 5.8 (2014): e1387-e1387.

Renkema, Kirsten Y., et al. "Novel perspectives for investigating congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)." *Nephrology Dialysis Transplantation* 26.12 (2011): 3843-3851.

Riolo, Giulia, et al. "miRNA targets: from prediction tools to experimental validation." *Methods and protocols* 4.1 (2020): 1.

Robinson, Mark D., Davis J. McCarthy, and Gordon K. Smyth. "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data." *bioinformatics* 26.1 (2010): 139-140.

Rodriguez, Maria M. "Congenital anomalies of the kidney and the urinary tract (CAKUT)." *Fetal and pediatric pathology* 33.5-6 (2014): 293-320.

Rogers, Sharon A., Gabriella Ryan, and Marc R. Hammerman. "Metanephric transforming growth factor-alpha is required for renal organogenesis in vitro." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 262.4 (1992): F533-F539.

Rossi, Simona, et al. "Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatics and therapeutic implications." *Mammalian Genome* 19.7 (2008): 526-540.

Rupaimoole, Rajesha, and Frank J. Slack. "MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases." *Nature reviews Drug discovery* 16.3 (2017): 203-222.

Saifudeen, Zubaida, et al. "p53 regulates metanephric development." *Journal of the American Society of Nephrology* 20.11 (2009): 2328-2337.

Sakurai, Hiroyuki, and Sanjay K. Nigam. "In vitro branching tubulogenesis: implications for developmental and cystic disorders, nephron number, renal repair, and nephron engineering." *Kidney international* 54.1 (1998): 14-26.

Sakurai, Hiroyuki, et al. "EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 273.3 (1997): F463-F472.

Salmena, Leonardo, et al. "A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?." *cell* 146.3 (2011): 353-358.

- Sanna-Cherchi, Simone, et al. "Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations." *The American Journal of Human Genetics* 91.6 (2012): 987-997.
- Sanna-Cherchi, Simone, et al. "Familial vesicoureteral reflux: testing replication of linkage in seven new multigenerational kindreds." *Journal of the American Society of Nephrology* 16.6 (2005): 1781-1787.
- Sanna-Cherchi, Simone, et al. "Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia." *Pediatric nephrology* 22 (2007): 1675-1684.
- Sanna-Cherchi, Simone, et al. "Genetic basis of human congenital anomalies of the kidney and urinary tract." *The Journal of clinical investigation* 128.1 (2018): 4-15.
- Sanyanusin, Phaikasame, et al. "Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux." *Nature genetics* 9.4 (1995): 358-364.
- Sariola, H. "The neurotrophic factors in non-neuronal tissues." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58 (2001): 1061-1066.
- Schedl, Andreas. "Renal abnormalities and their developmental origin." *Nature Reviews Genetics* 8.10 (2007): 791-802.
- Schuchardt, Anita, et al. "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* 367.6461 (1994): 380-383.
- Schwaderer, Andrew L., et al. "Renal anomalies in family members of infants with bilateral renal agenesis/adysplasia." *Pediatric nephrology* 22 (2007): 52-56.
- Sebat, Jonathan, et al. "Large-scale copy number polymorphism in the human genome." *Science* 305.5683 (2004): 525-528.
- Sekine, Michiko, et al. "Selective depletion of mouse kidney proximal straight tubule cells causes acute kidney injury." *Transgenic research* 21 (2012): 51-62.
- Seo, Bong Jong, Sang Hoon Yoon, and Jeong Tae Do. "Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation." *International journal of molecular sciences* 19.12 (2018): 3893.
- Shakeri, Raheleh, Asma Kheirollahi, and Jamshid Davoodi. "Apaf-1: Regulation and function in cell death." *Biochimie* 135 (2017): 111-125.
- Sindhu, K. J., Nalini Venkatesan, and Devarajan Karunagaran. "MicroRNA interactome multiomics characterization for cancer research and personalized medicine: an expert review." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 25.9 (2021): 545-566.
- Siomou, Ekaterini, et al. "Copy-number variation analysis in familial nonsyndromic congenital anomalies of the kidney and urinary tract: Evidence for the causative role of a transposable element-associated genomic rearrangement." *Molecular medicine reports* 15.6 (2017): 3631-3636.
- Sirin, Yasemin, and Katalin Susztak. "Notch in the kidney: development and disease." *The Journal of pathology* 226.2 (2012): 394-403.
- Song, Guisheng, Yuxia Zhang, and Li Wang. "MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, and inhibits tumor cell migration and focus formation." *Journal of Biological Chemistry* 284.46 (2009): 31921-31927.
- Song, Renfang, and Ihor V. Yosypiv. "Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract." *Pediatric nephrology* 26 (2011): 353-364.
- Song, Xiao-Feng, et al. "Expression of Cyt-c-mediated mitochondrial apoptosis-related proteins in rat renal proximal tubules during development." *Nephron* 135.1 (2017): 77-86.
- Song, Xiaofeng, et al. "Predicting miRNA-mediated gene silencing mode based on miRNA-target duplex features." *Computers in Biology and Medicine* 42.1 (2012): 1-7.

Spasojević-Dimitrijeva, Brankica, et al. "The IL-6-174G/C polymorphism and renal scarring in children with first acute pyelonephritis." *Pediatric Nephrology* 25 (2010): 2099-2106.

Stankiewicz, Paweł, and James R. Lupski. "Structural variation in the human genome and its role in disease." *Annual review of medicine* 61 (2010): 437-455.

Stanković, Aleksandra, et al. "Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT." *Clinical biochemistry* 43.1-2 (2010): 71-75.

Stanković, Aleksandra. "Promising biomarkers in pediatric chronic kidney disease through the kaleidoscope of CAKUT background complexity." *Pediatric Nephrology* 36.6 (2021): 1321-1325.

Stark, Kevin, et al. "Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4." *Nature* 372.6507 (1994): 679-683.

Stewart, Katherine, and Maxime Bouchard. "Kidney and urinary tract development: an apoptotic balancing act." *Pediatric Nephrology* 26.9 (2011): 1419-1425.

Stonebrook, Emily, Monica Hoff, and John David Spencer. "Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: a clinical review." *Current treatment options in pediatrics* 5 (2019): 223-235.

Subramanian, Subbaya, and Clifford J. Steer. "MicroRNA regulation in health and disease." *Genes* 10.6 (2019): 457.

Sudmant, Peter H., et al. "An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes." *Nature* 526.7571 (2015): 75-81.

Susztak, Katalin, et al. "Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy." *Diabetes* 55.1 (2006): 225-233.

Takahashi, Kazuhide, and Ichiro Kaneko. "Changes in nuclease sensitivity of mammalian cells after irradiation with ⁶⁰Co γ -rays." *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 48.3 (1985): 389-395.

Tao, Yuan Sheng, et al. "Expression of brain-derived neurotrophic factor in kidneys from normal and cyclosporine-treated rats." *BMC nephrology* 19 (2018): 1-12.

Tarazona, Sonia, et al. "Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package." *Nucleic acids research* 43.21 (2015): e140-e140.

Thapar, Anita, and Miriam Cooper. "Copy number variation: what is it and what has it told us about child psychiatric disorders?." *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 52.8 (2013): 772.

Thivierge, Caroline, et al. "Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease." *Molecular and cellular biology* (2006).

Thomas, Rosemary, et al. "HNF1B and PAX2 mutations are a common cause of renal hypodysplasia in the CKiD cohort." *Pediatric nephrology* 26 (2011): 897-903.

Thomasova, Dana, et al. "p53-independent roles of MDM2 in NF- κ B signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases." *Neoplasia* 14.12 (2012): 1097-1101.

Thomson, Daniel W., et al. "On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors." *PloS one* 8.1 (2013): e55214.

Threadgill, David W., et al. "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype." *Science* 269.5221 (1995): 230-234.

Togawa, Atsushi, et al. "Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDI α ." *Oncogene* 18.39 (1999): 5373-5380.

Toka, Hakan R., et al. "Congenital anomalies of kidney and urinary tract." *Seminars in nephrology*. Vol. 30. No. 4. WB Saunders, 2010.

Tsutsumi, Akihisa, et al. "Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1." *Nature structural & molecular biology* 18.10 (2011): 1153-1158.

Vaishnavi, Varadarajan, et al. "Insights on the functional impact of microRNAs present in autism-associated copy number variants." *PloS one* 8.2 (2013): e56781.

Valinezhad Orang, Ayla, Reza Safaralizadeh, and Mina Kazemzadeh-Bavili. "Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation." *International journal of genomics* 2014 (2014).

Veerappa, Avinash M., et al. "Copy number variations burden on miRNA genes reveals layers of complexities involved in the regulation of pathways and phenotypic expression." *PLoS One* 9.2 (2014): e90391.

Verbitsky, Miguel, et al. "Genomic imbalances in pediatric patients with chronic kidney disease." *The Journal of clinical investigation* 125.5 (2015): 2171-2178.

Verbitsky, Miguel, et al. "The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract." *Nature genetics* 51.1 (2019): 117-127.

Verzola, Daniela, et al. "Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells." *Kidney international* 65.4 (2004): 1252-1261.

Vischioni, Chiara, et al. "miRNAs copy number variations repertoire as hallmark indicator of cancer species predisposition." *Genes* 13.6 (2022): 1046.

Vivante, Asaf, et al. "Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans." *Pediatric nephrology* 29 (2014): 695-704.

Wahid, Fazli, et al. "MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1803.11 (2010): 1231-1243.

Wang, Kun, et al. "miR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1." *Nature communications* 3.1 (2012): 781.

Wang, Liming, et al. "Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases." *Kidney international* 81.11 (2012): 1075-1085.

Warnica, William, et al. "Copy number variable microRNAs in schizophrenia and their neurodevelopmental gene targets." *Biological psychiatry* 77.2 (2015): 158-166.

Weber, Stefanie, et al. "Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study." *Journal of the American Society of Nephrology* 17.10 (2006): 2864-2870.

Wellik, Deneen M., Patrick J. Hawkes, and Mario R. Capecchi. "Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction." *Genes & development* 16.11 (2002): 1423-1432.

Westland, Rik, et al. "Copy number variation analysis identifies novel CAKUT candidate genes in children with a solitary functioning kidney." *Kidney international* 88.6 (2015): 1402-1410.

Wiszniewska, Joanna, et al. "Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing." *European Journal of Human Genetics* 22.1 (2014): 79-87.

Wu, Xudong, Dinglin Zhang, and Guohui Li. "Insights into the regulation of human CNV-miRNAs from the view of their target genes." *BMC genomics* 13 (2012): 1-13.

Wu, Yuan, et al. "lncRNA H19 promotes matrix mineralization through up-regulating IGF1 by sponging miR-185-5p in osteoblasts." *BMC Molecular and Cell Biology* 20 (2019): 1-10.

Xia, Endi, et al. "MicroRNA induction by copy number gain is associated with poor outcome in squamous cell carcinoma of the lung." *Scientific Reports* 8.1 (2018): 15363.

Xie, Chang, et al. "Endoderm development requires centrioles to restrain p53-mediated apoptosis in the absence of ERK activity." *Developmental cell* 56.24 (2021): 3334-3348.

Xie, Mingyi, and Joan A. Steitz. "Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses." *RNA biology* 11.6 (2014): 673-681.

Xie, Shuping, et al. "Long non-coding RNA ZFAS1 sponges miR-484 to promote cell proliferation and invasion in colorectal cancer." *Cell cycle* 17.2 (2018): 154-161.

Xu, Pin-Xian, et al. "Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney." (2003): 3085-3094.

Xue, Rong, et al. "miR-185 affected the EMT, cell viability, and proliferation via DNMT1/MEG3 pathway in TGF- β 1-induced renal fibrosis." *Cell Biology International* 43.10 (2019): 1152-1162.

Yanagida-Asanuma, Etsuko, et al. "Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42: IRSp53: Mena signaling complexes in kidney podocytes." *The American journal of pathology* 171.2 (2007): 415-427.

Ye, Chen, et al. "MDM2 mediates fibroblast activation and renal tubulointerstitial fibrosis via a p53-independent pathway." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 312.4 (2017): F760-F768.

Yoshida, Hiroki, et al. "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development." *Cell* 94.6 (1998): 739-750.

Yu, Heng, et al. "Long noncoding RNA NEAT1 promotes progression of glioma as a ceRNA by sponging miR-185-5p to stimulate DNMT1/mTOR signaling." *Journal of cellular physiology* 236.1 (2021): 121-130.

Yuan, Cheng, et al. "The role of notch3 signaling in kidney disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020 (2020).

Yuan, Quan, et al. "MiR-185-5p ameliorates endoplasmic reticulum stress and renal fibrosis by downregulation of ATF6." *Laboratory Investigation* 100.11 (2020): 1436-1446.

Zeng, Fenghua, et al. "ErbB4 isoforms selectively regulate growth factor-induced Madin-Darby canine kidney cell tubulogenesis." *Molecular biology of the cell* 18.11 (2007): 4446-4456.

Zhang, Feng, and James R. Lupski. "Non-coding genetic variants in human disease." *Human molecular genetics* 24.R1 (2015): R102-R110.

Zhang, Feng, et al. "Copy number variation in human health, disease, and evolution." *Annual review of genomics and human genetics* 10 (2009): 451-481.

Zhang, Lin, et al. "microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.24 (2006): 9136-9141.

Zhang, Ran, et al. "lncRNA Ttc3-209 promotes the apoptosis of retinal ganglion cells in retinal ischemia reperfusion injury by targeting the miR-484/Wnt8a axis." *Investigative ophthalmology & visual science* 62.3 (2021): 13-13.

Zhang, Song, and Feng Zhu. "Comment on: "MicroRNA mimics or inhibitors as antiviral therapeutic approaches against COVID-19"." *Drugs* 81.14 (2021): 1691-1692.

Zhou, Jian, et al. "MicroRNA-26a targets the mdm2/p53 loop directly in response to liver regeneration." *International journal of molecular medicine* 44.4 (2019): 1505-1514.

Ziv, Yael, et al. "Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM-and KAP-1 dependent pathway." *Nature cell biology* 8.8 (2006): 870-876.

Biografija

Kristina Mitrović, rođena je 05. maja 1992. godine u Beogradu. Diplomirala je 2016. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, stekavši zvanje diplomirani biolog. Iste godine je upisala master akademske studije, takođe na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu i završila sa master radom pod nazivom: „Analiza ekspresije gena Ankrd2 kokoši“ u septembru 2017. godine. Doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Genetika upisala je 2017. godine, a od 2018. godine angažovana je na projektu "Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti" kojim je rukovodila dr Aleksandra Stanković do kraja 2019. godine. Od 2020. godine angažovana je na temi „Genetska osnova hronične inflamacije“, br. 0802402, finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, čiji je koordinator dr Aleksandra Stanković. Od jula 2020. godine do jula 2022. godine bila je angažovana na PROMIS projektu “miFaDriCa”, ev. br. 6066923, koji je finansirao Fond za nauku Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Ivana Jovanovića, a tematika doktorske disertacije bila je u sklopu ovog projekta. Od januara 2023. godine angažovana je na projektu IDEJE “FerroReg”, ev. br. 7753406 koji finansira Fond za nauku Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Maje Živković. Kristina Mitrović je do danas objavila 5 radova u časopisima međunarodnog značaja, od kojih 2 kao prvi autor i ima 5 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34). Član je srpskog društva za molekularnu biologiju, društva genetičara Srbije i srpskog društva za ekstracelularne vezikule SrbEVs.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Кристина Митровић _____

број индекса _____ Б3022/2017 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2024.

Кристина Митровић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Кристина Митровић

Број индекса Б3022/2017

Студијски програм Биологија

Наслов рада “Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека”.

Ментори

др Иван Јовановић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ – Институт од националног значаја за Републику Србију

др Катарина Зељић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Потписани/а Кристина Митровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2024.

Кристина Митровић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Идентификација микро РНК у регионима генома са ретким структурним варијантама као потенцијалних генетичких узрочника за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2024.

Кристина Мишковић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.