

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan G. Jovanović

Analiza ekspresije celokupnog genoma u
cilju identifikacije ključnih gena i mikro RNK
za nastanak urođenih anomalija bubrega i
urinarnog trakta čoveka

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ivan G. Jovanović

Analysis of whole genome expression in
order to identify the key genes and
microRNAs for the occurrence of congenital
anomalies of the kidney and urinary tract in
humans

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

dr Katarina Zeljić, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Marina Stamenković-Radak, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekata: „Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti“ (OI175085) i „Integralna studija identifikacije regionalnih genetskih faktora rizika i faktora rizika životne sredine za masovne nezarazne bolesti humane populacije u Srbiji“ (III41028). Rukovodiocu projekta OI175085 i glavnom mentoru ove doktorske disertacije, dr Aleksandri Stanković, naučnom savetniku, se iskreno zahvaljujem što mi je pružila priliku da se bavim genetičkim istraživanjima, što me je sve vreme usmeravala da kombinujem molekularnu biologiju i informatiku, vodila stručnim savetima, na energiji i pomoći koju je uložila tokom realizacije ovog rada.

Mentoru, docentu, dr Katarini Zeljić se zahvaljujem na velikoj pomoći tokom pregleda doktorske disertacije.

Prof. dr Marini Stamenković-Radak se zahvaljujem na pregledu i oceni rada i korisnim sugestijama.

Dr Draganu Alavantiću, naučnom savetniku, hvala na stručnoj pomoći i pruženoj podršci kao i na viziji koja je omogućila postojanje i opremanje najsavremenije laboratorije iz oblasti molekularne genetike u Srbiji, bez koje eksperimenti na kojima je zasnovana ova disertacija ne bi bili mogući.

Dr Maji Živković, naučnom savetniku i dr Tamari Đurić-Delić, višem naučnom saradniku, hvala na pomoći u analizi rezultata i stručnim savetima i sugestijama koje su značajno unapredile kvalitet ove disertacije. Dr Tamari, velikom gurmanu, se posebno zahvaljujem na večitoj spremnosti da u 11h „zveknemo“ neki jači doručak. Dr Maji se posebno zahvaljujem na angažovanju oko održavanja moje zanatske svestranosti i fizičke spremnosti, kao i oko odlazaka na stručnu praksu i timske pripreme.

Zahvaljujem se kolegama sa Univerzitetske Dečje Klinike „Tiršova“, a posebno prof. dr Mirjani Kostić i prof. dr Zoranu Krstiću, na dugogodišnjoj saradnji i podršci, i u prikupljanju i kliničkoj karakterizaciji uzoraka koji su analizirani u ovoj studiji, a bez kojih ova disertacija ne bi bila moguća.

Svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku se zahvaljujem na velikoj podršci, uspešnom timskom radu i neprestanoj dominaciji. *Vinča's blues will play forever!*

Prijateljima hvala što su uvek bili uz mene.

Mojoj porodici hvala na svemu što su mi pružili. Više od svih svojih dosadašnjih uspeha, ponosan sam što imam vas.

Evi hvala što postoji.

Mojoj Jaci se najtoplije zahvaljujem što je i u najlepšim i u najtežim trenucima bila pored mene i nesebično mi davala svoju ljubav.

Analiza ekspresije celokupnog genoma u cilju identifikacije ključnih gena i mikro RNK 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 razlog nastanka čak polovine slučajeva terminalne bubrežne insuficijencije ali patofiziološka osnova ove bolesti još uvek nije poznata u potpunosti pa je samim tim otežana prevencija i terapija. U ovoj studiji je, upoređivanjem ekspresije celokupnog genoma u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om i zdravih kontrola, identifikovano 78 diferencijalno eksprimiranih gena. Bioinformatičkom analizom je po prvi put zaključeno da postoji visok nivo kompleksnosti bioloških procesa i molekularnih puteva u tkivu čoveka koji su u CAKUT-u diferencijalno regulisani i čije važne interakcije se mogu predstaviti sa sedam molekularnih mreža, od kojih četiri sadrže gene sa funkcijama koje se direktno mogu asociirati sa CAKUT-om. Eksperimentalnom validacijom ključnih mreža qRT-PCR metodom utvrđen je povišen nivo iRNK za gene *LCN2* (7,6 puta), *PROM1* (8 puta) i *SOSTDC1* (5,6 puta) i snižen nivo iRNK za gene *RASD1* (4,5 puta), *INA* (3,3 puta) i *TAC3* (6,6 puta) u tkivu uretera pacijenata u poređenju sa kontrolnim tkivom, koji mogu biti molekularni markeri za CAKUT. Ove mreže su ujedno i prikaz interakcija ključnih molekula u CAKUT-u i predstavljaju temelj budućih funkcionalnih studija. Primenom metode koja povezuje podatke sa genskog ekspresionog čipa i predikcije vezujućih mesta različitih miRNK iz više predikcionih algoritama, sa unapređenom rezolucijom, identifikovane su miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u CAKUT-u u odnosu na zdrave kontrole. Validacijom ključnih miRNK qRT-PCR metodom je identifikovan povišen nivo miR-144 (5,7 puta) u tkivu uretera pacijenata u odnosu na kontrole, koji može biti molekularni marker za CAKUT.

Ključne reči

CAKUT, Bioinformatika, Integrativni pristup, Mikro RNK, Pedijatrija, Biomarker, Razviće, Ekspresija gena, Genski ekspresioni čip.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj: [575.113:616.6]:57.087 (043.3)

Analysis of whole genome expression in order to identify the key genes and microRNAs for the occurrence of congenital anomalies of the kidney and urinary tract in humans

Abstract

Congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) are the cause for half of the cases with renal failure, but pathophysiological basis of this disease is not fully known. Therefore, the therapy and prevention of the disease is difficult. In this study, by comparing the whole-genome expression in the ureter tissue of patients with CAKUT and healthy controls, 78 differentially expressed genes were identified. By employing bioinformatical analysis it was concluded that there is a high level of complexity of biological processes and molecular pathways, differentially regulated in CAKUT, whose important interactions can be represented with seven molecular networks, of which four contain genes with functions that can be directly associated with CAKUT. Experimental validation of key networks by qRT-PCR method identified elevated mRNA levels of *LCN2* (7.6 fold), *PROM1* (8 fold) and *SOSTDC1* (5.6 fold), and decreased mRNA levels of *RASD1* (4.5 fold), *INA* (3.3 fold) and *TAC3* (6.6 fold) in the ureter tissue of the patients compared to control tissue, which may be molecular markers for CAKUT. These networks display the interactions of key molecules in CAKUT and provide the basis for future functional studies, as well. By applying the method that links microarray gene expression data and prediction of miRNA binding sites from several prediction algorithms, with enhanced resolution, miRNAs with potentially upregulated expression in CAKUT compared to healthy controls were identified. Validation of key miRNAs by qRT-PCR method identified increased level of miR-144 (5.7 fold) in the ureter tissue of the patients compared to controls, which may be a molecular marker for CAKUT.

Key words

CAKUT, Bioinformatics, Integrated approach, micro RNA, Pediatrics, Biomarker, Development, Gene expression, Microarray.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

UDC number: [575.113:616.6]:57.087 (043.3)

Skraćenice

- 3'UTR** – (engl. *3' Untranslated Region*) 3' netranslatirajući region iRNK
- AGO 1-4** – (engl. *Argonaute 1-4*) Argonaut proteini 1-4
- AM** – (engl. *Adrenomedullin*) Adrenomedulin
- AngII** – (engl. *Angiotensin II*) Angiotenzin II
- AT2R** – (engl. *Angiotensin II Receptor Type 2*) Angiotenzin II receptor tipa 2
- BGA** – (engl. *Between Group Analysis*) Analiza između grupa
- BMP7** – (engl. *Bone Morphogenetic Protein 7*) Koštani morfogenetski protein-7
- CAKUT** – (engl. *Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract*) Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta
- CDC5L** – (engl. *Cell Division Cycle 5 Like*) Protein sličan proteinu ciklusa ćelijske deobe 5
- Cd-MT** – Kompleks kadmijum-metalotionein
- cDNK** – (engl. *Complementary DNA*) Komplementarna DNK
- CHD1L** – (engl. *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1-Like*) DNK vezujući protein sličan helikazi sa hromodomenom
- CIA** – (engl. *Co-Inertia Analysis*) Ko-inerciona analiza
- CIA/BGA** – (engl. *Co-Inertia Analysis/Between Group Analysis*) Ko-inerciona analiza sa unapred definisanim grupama upotrebom analize između grupa
- CoMeTa** – (engl. *Co-expression Meta-analysis of miR Target genes*) Ko-ekspresiona meta analiza miRNK ciljnih gena
- COOL** – (engl. *CO-Operational Level*) Ko-ekspresiona analiza za predikciju funkcionalnih puteva miRNK
- cRNK** – (engl. *Complementary RNA*) Komplementarna RNK
- DAVID** – (engl. *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) Baza za anotaciju, vizuelizaciju i integrativni pronalazak bioloških procesa i molekularnih funkcija asociраниh sa diferencijalno eksprimiranim genima
- DEG** – Diferencijalno Eksprimirani Geni
- DGCR8** – (engl. *DiGeorge syndrome Chromosomal [or Critical] Region 8*) Di Džordž sindrom kritični region 8 subjedinica mikroprocesorskog kompleksa
- DNKaza I** – Dezoksiribonukleaza I

DSTYK – (engl. *Dual Serine/Threonine and Tyrosine Protein Kinase*) Dvostruka serin/treonin i tirozin protein kinaza

EMT – Epitelijalno-Mezenhimalna Tranzicija

EMX2 – (engl. *Empty Spiracles Homeobox 2*) Homolog 2 *Empty Spiracles* gena

ET-1 – (engl. *Endothelin 1*) Endotelin 1

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

FC – (engl. *Fold Change*) pokazuje koliko je puta nivo iRNK ili miRNK viši/niši u ciljnoj grupi u odnosu na referentnu grupu uzoraka.

FE – (engl. *Fold Enrichment*) mera asocijacije seta diferencijalno eksprimiranih gena sa određenim anotacionim terminom

FGF8 – (engl. *Fibroblast Growth Factor 8*) Faktor rasta fibroblasta 8

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

FREM2 – (engl. *FRAS1 Related Extracellular Matrix Protein 2*) Protein 2 asociran sa Frejzerovom subjedinicom 1 kompleksa ekstraćelijskog matriksa

GATA3 – (engl. *GATA binding protein 3*) Transkripcioni regulator specifičan za T ćelije

GDNF – (engl. *Glial cell Derived Neurotrophic Factor*) Neurotropni faktor poreklom od glijalnih ćelija

GEČ – Genski Ekspresioni Čip

GEO – (engl. *Gene Expression Omnibus*) Javna baza rezultata eksperimenata iz polja funkcionalne genomike

GO – Genska Ontologija

GUDMAP – (engl. *The Genitourinary Developmental Molecular Anatomy Project*) Projekat razvojne molekularne anatomije genitourinarnog trakta

HNF1B – (engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox B*) Hepatocitni nukleusni faktor 1 homeoboks B

IL-17A – Interleukin-17A

IM – Intermedijarni Mezoderm

INA – (engl. *Internexin Neuronal Intermediate Filament Protein Alpha*) Protein neuronskog intermedijarnog filamenta interneksin alfa

IPA – (engl. *Ingenuity Pathway Analysis*) Softver za analizu molekularnih puteva proizveden od strane Ingenuity-a

IVU – Intravenska Urografija

LCN2 – (engl. *Lipocalin 2*) Lipokalin 2

LIM1 – (engl. *LIM Homeobox 1*) Transkripcioni regulator sa LIM domenom

MIAME – (engl. *Minimum Information About a Microarray Experiment*) Minimalna informacija o eksperimentu na genskom ekspresionom čipu

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

miRCos – (engl. *miRNA Communities*) miRNK zajednice

miRNK – Mikro RNK

MM – Metanefrički Mezenhim

MT – Metalotionein

MU – Primarni Megaureter

NGF – (engl. *Nerve Growth Factor*) Faktor rasta nerava

nNOS – (engl. *Neural Nitric Oxide Synthase*) Neuralna sintetaza azot oksida

NPY – (engl. *Neuropeptide Y*) Neuropeptid Y

NSC – (engl. *Non Symmetric Correspondence Analysis – NSC*) Analiza asimetrične korespondencije

OMU – Opstruktivni Megaureter

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

PAX2/8 – (engl. *Paired Box 2/8*) *Paired Box* transkripcioni regulatori 2/8

pre-miRNK – Prekursor miRNK

pri-miRNK – Primarni miRNK transkript

PROM1 – (engl. *Prominin 1*) Prominin 1

Ptprf – (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type F*) Protein tirozin fosfataza, receptor tip F

Ptprs – (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type S*) Protein tirozin fosfataza, receptor tip S

PVUR – Primarni Veziko-Ureteralni Refluks

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

RASD1 – (engl. *Ras related Dexamethasone induced 1*) Deksametazonom indukovani Ras srodni protein 1

RefSeq – Baza referentnih sekvenci

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

RIN – (engl. *RNA Integrity Number*) Parametar integriteta RNK

RISC – (engl. *RNA Induced Silencing Complex*) Kompleks za RNK indukovano utišavanje ekspresije gena

ROBO2 – (engl. *Roundabout Guidance Receptor 2*) Receptor kružnog toka 2

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

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

SIX5 – (engl. *Sine Oculis Homeobox Homolog 5*) *Sine Oculis* homolog 5

SLIT2 – (engl. *Slit Guidance Ligand 2*) Ligand 2 za familiju receptora ROBO

SOSTDC1 – (engl. *Sclerostin Domain Containing 1*) Ektodermalni inhibitor koštanog morfogenskog proteina

SOSTDC1^{-/-} – Jedinka nokaut za *SOSTDC1* gen

TAC3 – (engl. *Tachykinin 3*) Tahikinin 3

TGF-β – (engl. *Transforming Growth Factor β*) Transformišući faktor rasta beta

UPJO – (engl. *Ureteropelvic Junction Obstruction*) Opstrukcija na ureteteropelvičnom spoju

UPS – Uretero-Pelvični Spoj

UUO – (engl. *Unilateral Ureteral Obstruction*) Unilateralna opstrukcija uretera

UVZ – Uretero-Vezikularni Spoj

VCUG – (engl. *Voiding Cysto-Uretrography*) Mikcijska cisto-uretrografija

VUR – Veziko-Ureteralni Refluks

VZU – Valvula Zadnje Uretre

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Embrionalno razviće bubrega i urinarnog trakta i CAKUT	2
1.1.1. Embrionalno razviće bubrega i urinarnog trakta	2
1.1.2. Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta	4
1.1.2.1. Kliničke karakteristike CAKUT-a	4
1.1.2.2. Tipovi urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta	5
1.1.3. Genetička osnova CAKUT-a.....	8
1.2. Određivanje ekspresije celokupnog genoma tehnologijom genskog ekspresionog čipa kao pristup u pronalaženju ključnih gena za nastanak bolesti	10
1.3. Bioinformatički pristup u analizi ekspresije celokupnog genoma.....	11
1.4. MikroRNK.....	12
1.4.1. Biogeneza i funkcija miRNK.....	13
1.4.1.1. Biogeneza miRNK.....	13
1.4.1.2. Uloga miRNK u regulaciji geneske ekspresije	16
1.4.2. miRNK kao biomarker i terapeutik	17
1.5. miRNK u CAKUT-u	18
1.6. Bioinformatički pristup u izučavanju biologije miRNK.....	19
1.6.1 miRBase.....	19
1.6.2. Algoritmi za predikciju miRNK vezujućih mesta.....	20
1.6.2.1. Ko-ekspresiona meta analiza miRNK ciljnih gena.....	21
1.6.3. Upotreba ko–inercione analize u asocijaciji miRNK sa različitim stanjima i oboljenjima	24
2. Hipoteza i ciljevi.....	25
3. Materijal i metode	27

3.1. Materijal.....	27
3.1.1. Uzorak.....	27
3.1.2. Aparatura.....	29
3.2. Metode.....	30
3.2.1. Ekstrakcija ukupne RNK iz tkiva uretera	31
3.2.2. Merenje koncentracije i provera kvaliteta ekstrahovane RNK.....	31
3.2.3. Reverzna transkripcija	31
3.2.4. Određivanje relativnog nivoa iRNK i mikro RNK metodom PCR u realnom vremenu.....	32
3.2.4.1. Kvantitativna analiza relativne ekspresije validiranih gena i miRNK ...	34
3.2.5. Određivanje ekspresije gena celokupnog genoma na GEČ-u.....	34
3.2.6. Analiza ekspresije celokupnog genoma	35
3.2.6.1. Određivanje kvaliteta podataka o ekspresiji celokupnog genoma	35
3.2.6.2. Utvrđivanje diferencijalno eksprimiranih gena na nivou celokupnog genoma i bioinformatička analiza	35
3.2.7. Identifikacija miRNK potencijalno asociranih sa CAKUT-om na osnovu ekspresije celokupnog genoma i predikcije miRNK ciljnih gena.....	37
3.2.7.1. Validacija ko-inercione analize na javno dostupnim podacima o genskoj ekspresiji	37
3.2.7.2. Integracija predikcija miRNK ciljnih gena iz CoMeTa u CIA i identifikacija miRNK potencijalno asociranih sa CAKUT-om.....	40
3.2.7.3. Funkcionalna anotacija eksperimentalno validiranih miRNK u CAKUT-u.....	43
4. Rezultati.....	44
4.1. Identifikacija ključnih gena, molekularnih puteva i mreža u patogenezi CAKUT-a kod čoveka	44
4.1.1. Kvalitet podataka o genskoj ekspresiji celokupnog genoma u CAKUT-u i kontrolnim uzorcima.....	44

4.1.2.	Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u tkivu uretera dece sa CAKUT-om u poređenju sa zdravim kontrolama	44
4.1.3.	Identifikacija bioloških procesa, molekularnih funkcija i kanonskih molekularnih puteva asociranih sa DEG i algoritamsko kreiranje mreža interakcija DEG (GO ENA i IPA)	51
4.1.4.	Validacija najznačajnijih molekularnih mreža qRT-PCR metodom	58
4.2.	Validacija CIA metode u definisanju miRNK asociranih sa karakterističnim razlikama u ekspresiji genoma između dva različita fenotipa, na postojećim podacima.....	59
4.3.	Identifikacija i validacija ključnih miRNK u CAKUT-u	63
4.3.1	Identifikacija ključnih miRNK u CAKUT-u CIA metodom.....	63
4.3.2	Validacija ekspresije najznačajnijih miRNK u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om i kontrola	68
4.3.3.	Određivanje bioloških funkcija miR-144 povezanih sa CAKUT-om.....	70
5.	Diskusija	73
5.1.	Diferencijalno eksprimirani geni u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u poređenju sa tkivom uretera zdravih kontrola.....	74
5.1.1.	Fiziološki i patološki biološki procesi i molekularni putevi statistički značajno asocirani sa diferencijalno eksprimiranim genima	74
5.1.2.	Biološki smisao molekularnih mreža i gena odabranih za njihovu validaciju	84
5.2.	Identifikacija aktivnosti miRNK na osnovu transkriptoma u CAKUT-u.....	88
5.2.1.	Validacija CIA metode i unapređenje identifikacije ključnih miRNK potencijalno asociranih sa oboljenjem	88
5.2.2.	Identifikacija ključnih miRNK u CAKUT-u	89
5.2.3.	Povećanje nivoa miR-144 u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na tkivo uretera zdravih kontrola	90
5.3.	Ograničenja studije	92
6.	Zaključci.....	94
7.	Literatura	96

1. Uvod

Urinarni sistem je sistem organa sa primarno ekskretornom ulogom. Najvažnija funkcija urinarnog sistema je regulacija koncentracije vode, sadržaja neorganskih soli i volumena unutrašnje sredine. To se postiže ekskrecijom viška vode i neorganskih soli i održavanjem njihovog relativno konstantnog nivoa u organizmu. Bubrezi takođe vrše ekskreciju i metaboličkog otpada (urea, mokraćna kiselina, kreatinin, itd.), nastalog metaboličkim procesima u ćeliji, u urin i na taj način sprečavaju akumulaciju ovih toksina u organizmu i pomažu očuvanju homeostaze. Pored fiziološkog otpada, i druga strana jedinjenja, kao što su lekovi, pesticidi, dodaci hrani i njihovi metaboliti se odstranjuju iz organizma uz pomoć bubrežne filtracije. Bubrezi imaju takođe i endokrinu funkciju, sekretujući hormone eritropoetin, renin i 1,25-dihidroksivitamin D₃. Bubrezi vrše i glukoneogenezu, sintetišući glukozu iz aminokiselina i drugih prekursora i oslobađajući je u krv.

Budući da urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta (engl. *Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract* – CAKUT) obuhvataju različite tipove anatomskih i funkcionalnih razvojnih anomalija na nivou bubrega i/ili gornjih i donjih mokraćnih puteva, opisane vitalne funkcije ovog sistema su ugrožene. CAKUT je u osnovi 30-50% slučajeva terminalne bubrežne insuficijencije, ali patofiziološka osnova CAKUT-a još uvek nije poznata u potpunosti pa je samim tim otežana prevencija i terapija u cilju odlaganja gubitka funkcije bubrega koja vodi hemodijalizi i transplantaciji bubrega. Novi pristupi u istraživanju CAKUT-a, a naročito integrativni, možda će dati mogućnost za pronalaženje potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera, kao i za razvoj novih terapijskih pristupa.

Ova molekularno-genetička analiza traži odgovor na pitanje, koji ključni geni, biološki procesi, molekularni putevi, molekularne mreže i mikro RNK karakterišu CAKUT, analizom ekspresije celokupnog genoma u tkivu uretera kod dece sa urođenim anomalijama urinarnog sistema. Identifikacija novih molekularnih faktora nastanka CAKUTA i njihove promenjene ekspresije i nakon rođenja treba da posluži u budućnosti za prevenciju i terapiju ove bolesti u cilju

sprečavanja progresije gubitka funkcije bubrega, kao posledice CAKUT-a, do terminalne faze: hemodijalize i transplantacije.

1.1. Embrionalno razviće bubrega i urinarnog trakta i CAKUT

1.1.1. Embrionalno razviće bubrega i urinarnog trakta

Razviće bubrega i urinarnog trakta je složen proces koji se odvija u seriji sukcesivnih faza i zahteva interakciju različitih tipova embrionalnih tkiva (Vainio i Lin, 2002). Svaka faza je okarakterisana formiranjem sve naprednije forme bubrega (od pronefrosa, preko mezonefrosa do metanefrosa). Za vreme najranije, pronefros faze, bubreg je nefunkcionalan kod sisara. Poslednja faza, metanefros, započinje svoje razviće nakon 35 dana gestacije i ostaje kao definitivni adultni bubreg (Carlson, 2013; Saxen, 1987).

Pronefros nastaje od kranijalnog dela intermedijarnog mezoderma (IM) za vreme embrionalnog razvića. Epitelne ćelije ovog regiona se organizuju u serije tubula zvanih nefrotomi, koji su lateralno povezani sa pronefrotičkim kanalom. Međutim, pronefrotički kanal je zatvoren i ne učestvuje u izlučivanju filtriranog materijala van embriona. Za vreme embrionalnog razvića pronefrotički kanal nastavlja da raste u kranijalno-kaudalnom pravcu (Carlson, 2013; Saxen, 1987). Kaudalnim rastom pronefrosa kroz torako-lumbalni region, pronefrotički kanal stimuliše transformaciju okolnog IM u mezonefrotičke tubule. Svaka mezonefrotička tubula je snabdevena krvlju granom aorte koja na svom kraju formira kapilarni glomerul. Mezonefrotička tubula formira kapsulu oko glomerula omogućujući na taj način filtraciju krvi (analogno glomerulu definitivnog bubrega). Filtrat nastao na taj način protiče kroz mezonefrotičke tubule u produžetak pronefrotičkog kanala – mezonefrotički kanal ili Volfov kanal. U ovom trenutku nefrotomi pronefrosa degenerišu dok mezonefrotički kanal raste prema kaudalnom delu embriona i vezuje se za kloaku. Ovakav oblik sisarskog mezonefrosa je sličan onom kod riba i vodozemaca (Carlson, 2013, Saxen, 1987).

Za vreme pete nedelje gestacije, Volfov kanal formira evaginacije u blizini kloake zvane ureterovi pupoljci. Ureterov pupoljak raste posteriorno i prema glavi embriona. Izdužena stabljika ureterovog pupoljka tj. metanefrički kanal, kasnije će

za vreme razvića formirati ureter. Kako kranijalni deo ureterovog pupoljka raste kroz IM tj. nediferencirani mezenhim, on vrši indukciju tranzicije mezenhimskih ćelija u epitelne ćelije sabirnih kanala bubrega, proksimalnih i distalnih bubrežnih tubula i Henleove petlje. Nakon pupljenja uretera, zajednički nefrotički kanal, koji predstavlja segment Volfvog kanala od ureterovog pupoljka do kloake, degraduje apoptotskim mehanizmima, a distalni krajevi uretera se vezuju za region kloake koji će formirati mokraćnu bešiku, dok deo Volfvog kanala u tom regionu ostaje i formira uretru (Uetani i Bouchard, 2009). Sa druge strane, ćelije metanefričkog mezenhima indukuju grananje ureterovog pupoljka kroz proliferaciju i diferencijaciju, što rezultuje formiranjem sabirnih kanala bubrega i epitela bubrežne karlice (Potter, 1972; Blake i Rosenblum, 2014). U isto vreme, prekursori vaskularnih endotelijalnih ćelija započinju pozicioniranje na vrhovima bubrežnih tubula (Gao i sar., 2005). Ove ćelije će se diferencirati u ćelije krvnih sudova definitivnog glomerula (Carlson, 2013; Saxen, 1987).

Kod čoveka, sve grane ureterovog pupoljka i svi nefroni su formirani od 32. do 36. nedelje gestacije. Nefron je osnovna gradivna i funkcionalna jedinica bubrega koja vrši filtraciju krvi, reapsorpciju soli, vode i drugih jedinjenja neophodnih organizmu, kao i regulaciju krvnog pritiska i pH. Navedene funkcije su povezane sa određenim jedinicama nefrona formiranim na strogo kontrolisan način za vreme embrionalnog razvića. Međutim, ove strukture još uvek nisu u potpunosti tada sazrele i njihov razvoj se nastavlja i nakon rođenja. Procenjeno je da čovečiji organizam može imati od 300 000 do 1 milion nefrona po bubregu (Nyengaard i Bendtsen, 1992).

U završnim fazama razvića ovog organskog sistema apoptotski mehanizmi dovode do razgradnje mezonefrosa kod devojčica dok kod dečaka on učestvuje u formiranju gonada (Vainio i Lin, 2002). Bubrezi i ureteri su nakon ove faze razvića sposobni da proizvode urin koji fetus izlučuje u amnionsku tečnost. Daljim razvojem fetusa, torzo se izdužuje a bubrezi se rotiraju i migriraju naviše što utiče na povećavanje dužine uretera (Carlson, 2013). Definitivni bubreg čoveka, metanefros, je organ okarakterisan visokim nivoom strukturne i funkcionalne kompleksnosti, neophodan kako za ekskretornu funkciju, tako i za širok spektar

hormonalnih i homeostatskih regulatornih funkcija (Saxen, 1987, Widmaier i sar., 2011).

Indukcija razvića i diferencijacija bubrežnog tkiva i urinarnog trakta zahteva aktivnost većeg broja molekularnih mreža koje u sebi sadrže transkripcione regulatore (npr. PAX2/8, GATA3, LIM1, EYA1, SALL1, EMX2), molekule ekstraćelijskog matriksa (npr. heparan sulfat), faktore rasta i molekule ćelijske polarnosti (npr. FGF8 i BMP7), komponente signalnih puteva (npr. GDNF/RET, SLIT2/ROBO2, Wnt, Sonic Hedgehog, Notch) i mnogo drugih regulatornih faktora (Bouchard i sar., 2002; Grote i sar., 2006; Grote i sar., 2008; Kobayashi i sar., 2005; Xu i sar., 1999; Kohlhase i sar., 1998; Miyamoto i sar., 1997; Bullock i sar., 1998; Luo i sar., 1995, Grieshammer i sar., 2005; Cacalano i sar., 1998; Shakya i sar., 2005; Grieshammer i sar., 2004; Majumdar i sar., 2003; Carroll i sar., 2005; Tripathi i sar., 2010; Cheng i sar., 2007; Stankovic i sar., 2010, Djuric i sar., 2014; Uetani i Bouchard, 2009, Blake i Rosenblum, 2014; Dressler, 2009; Vainio i Lin, 2002). U projektu izučavanja molekularne anatomije razvića genitourinarnog trakta (engl. *GenitoUrinary Development Molecular Anatomy Project* – GUDMAP), osnovana je baza ekspresionih signala za sve specifične anatomske strukture genitourinarnog sistema (Brunskill i sar., 2008; McMahon i sar., 2008), a broj novootkrivenih molekula uključenih u razviće ovog organskog sistema svakodnevno raste. Međutim, vremenska i prostorna asocijacija molekula odgovornih za pravilnu nefrogenezu je daleko od kompletne (Uetani i Bouchard, 2009; Rumballe i sar., 2010).

1.1.2. Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta

1.1.2.1. Kliničke karakteristike CAKUT-a

Urođene anomalije bubrega i urinarnog trakta predstavljaju spektar strukturnih i funkcionalnih anomalija urinarnog sistema nastalih u toku intrauterinog razvića deteta. Ovo je veoma heterogeno oboljenje čija se simptomatologija može kretati od opstrukcija protoka urina u različitim nivoima urinarnog trakta, preko malformacija uretera, do različitih tipova bubrežne displazije pa čak i kompletne bubrežne ageneze (Schedl, 2007). Učestalost pojave

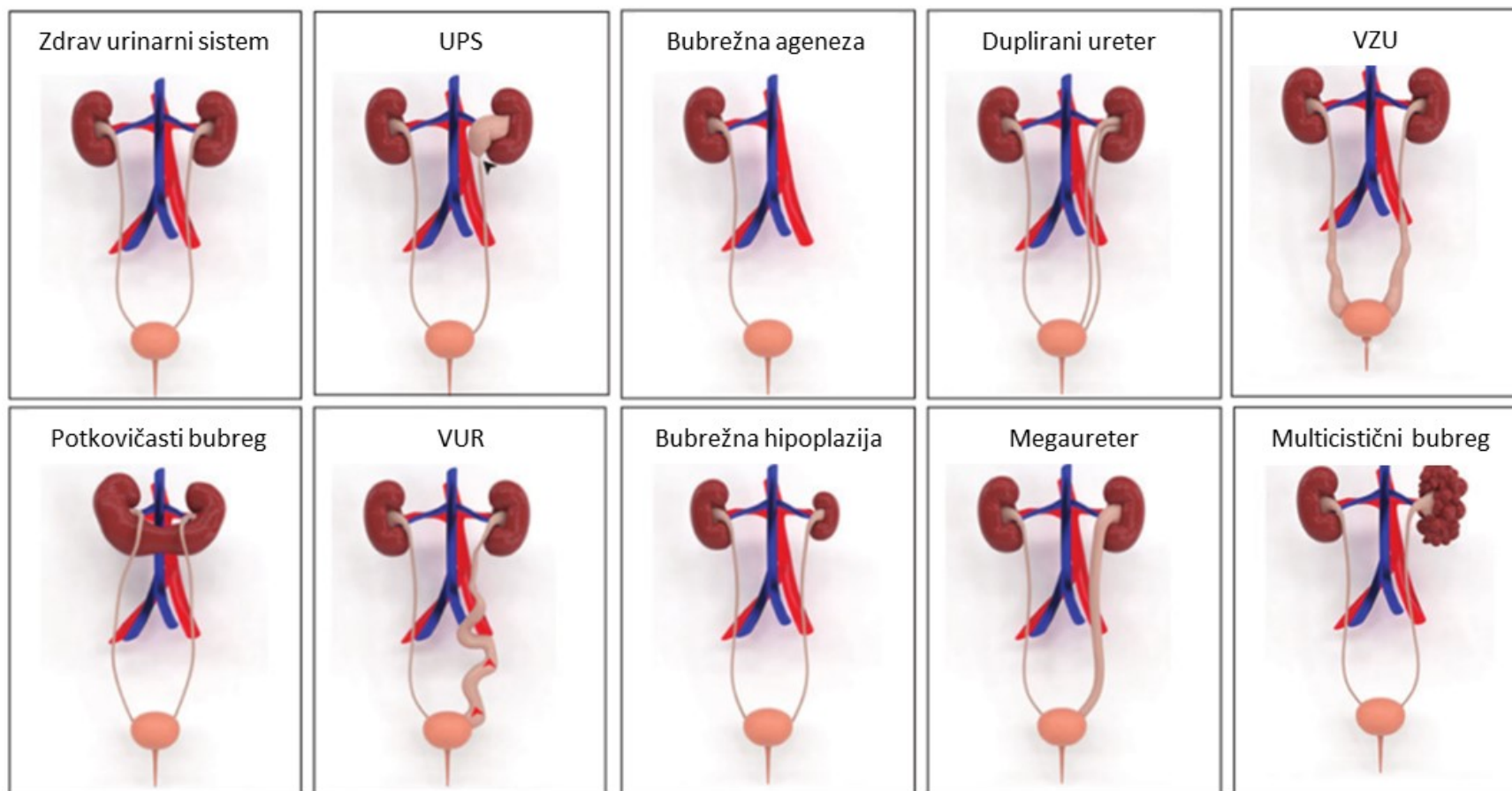
CAKUT-a kod novorođenčadi svrstava ovu bolest među najčešće urođene anomalije i iznosi 1:500 (Loane i sar., 2011). Takođe se procenjuje da je 20-30% svih genetički uzrokovanih malformacija dijagnostikovanih u prenatalnom periodu okarakterisano kao CAKUT. Ove urođene anomalije su najčešći uzrok terminalne bubrežne insuficijencije. Naime, čak 50% indikacija za transplantaciju bubrega u osnovi ima bilateralne urođene bubrežne hipoplazije i displazije (Harambat i sar., 2012).

Zbog doživotnog uticaja hroničnog oboljenja bubrega nastalog kao komplikacija CAKUT-a, i njegovih posledica, morbiditet i mortalitet je povećan kod osoba obolelih od ovih urođenih anomalija. Pored toga, hronično oboljenje bubrega i potreba za transplantacijom u dečijem uzrastu često rezultuje otežanim kako fizičkim razvojem, tako i psihosocijalnom integracijom (Groothoff, 2005). Često se kod obolelih od hronične bubrežne insuficijencije u ranom dobu mogu javiti i kardiovaskularne bolesti kao komplikacija (Krediet i Balafa, 2010). Ove višestruke posledice potvrđuju potrebu za eksperimentalnim i kliničkim istraživanjima mehanizama nastanka CAKUT-a (James i sar., 2010).

1.1.2.2. Tipovi urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta

CAKUT obuhvata širok spektar strukturnih i funkcionalnih abnormalnosti bubrega i urinarnog trakta (Schedl i sar., 2007) (Slika U1). Bubrezi sa malformacijama (aplazija, displazija, hipoplazija) imaju manji broj nefrona u odnosu na normalne bubrege, što rezultuje njihovom smanjenom funkcijom ili potpunom afunkcionalnošću. Svaka anomalija urinarnog trakta, anatomska (npr. stenoza nekog dela urinarnog trakta ili ektopija uretera) ili funkcionalna (npr. adinamični ili amuskularni segmenti uretera), koja onemogućava slobodan i jednosmeran protok urina kroz mokraćne puteve, dovodi do opstruktivnih uropatija. Ukoliko vremenom ne dođe do povlačenja opstrukcije, ili se ona hirurški ne ukloni, kao posledica nastaje oštećenje pa čak i gubitak funkcije bubrega. Tipovi opstrukcija su: opstrukcije na uretero-pelvičnom spoju (UPS), opstrukcije na uretero-vezikularnom spoju (UVZ), i opstrukcije na izlazu bešike – valvule zadnje uretre (VZU) (Woodward i Frank, 2002). Opstrukcije mogu izazvati proširenje tj.

dilataciju uretera usled usporenog protoka urina, mada dilatacije mogu imati i neopstruktivno poreklo. Primarnim megaureterom (MU) se nazivaju sve razvojne anomalije koje podrazumevaju normalnu mokraćnu bešiku i spoljašnji mokraćni odvod, a proširen ureter zbog intrinzičkih opstrukcija, refluksa kao jedinstvene anomalije ili je pak dilatacija idiopatska (Shokeir i Nijman, 2000). Primarni veziko-ureteralni refluks (PVUR) je termin koji opisuje razvojnu anomaliju uretera na nivou trigonuma bešike koja dovodi do refluksa urina iz bešike nazad u uretere i pijelokaliksni sistem, čineći na taj način funkcionalnu opstrukciju protoka urina koja može dovesti do dilatacija (Woodward i Frank, 2002).



Slika U1. Fenotipski spektar urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta. Preuzeto i adaptirano od Nicolaou i sar., 2015.

1.1.3. Genetička osnova CAKUT-a

Iako je većina slučajeva CAKUT-a sporadična, pojava više obolelih u porodici nije retka, što potvrđuje postojanje jake genetičke uslovljenosti za nastanak ove bolesti (Renkema i sar., 2011). Naime, oko 10% pacijenata obolelih od CAKUT-a ima u svojoj užoj porodici članove koji su takođe oboleli od ove bolesti (Winyard i Chitty, 2008), a koji su, međutim, često asimptomatski. Stoga, porodični slučajevi često bivaju previđeni, a učestalost ovog tipa CAKUT-a potcenjena (Renkema i sar., 2011). Iako CAKUT tipično nastaje kao pojedinačna malformacija u nesindromskom obliku, ove anomalije se mogu takođe javiti i u kombinaciji sa urođenim anomalijama van urinarnog sistema, kada je reč o sindromskom CAKUT-u (Renkema i sar., 2011).

Postoji više dokaza koji podržavaju pretpostavku da CAKUT može biti izazvan defektom u jednom genu (Nicolaou i sar., 2015). Izučavanjem porodica sa višestrukom pojavom CAKUT-a je bilo zaključeno da se bolest nasleđuje po autozomno dominantnom modelu sa redukovanom penetrabilnošću (Monn i Nordshus, 1984; McPherson i sar., 1987; Kaplan i sar. 1989; Doray i sar., 1999). Retki genetički sindromi okarakterisani fenotipom asociраним sa CAKUT-om i ekstrarenalnim anomalijama takođe podržavaju teoriju monogene etiologije (Vivante i sar., 2014). Skriningom mutacija u serijama pacijenata sa CAKUT-om otkriveni su geni kandidati koji mogu biti uzrok nastanka ove bolesti po autozomno dominantnom ili, ređe, recesivnom obrascu nasleđivanja (Vivante i sar., 2014). Međutim, ova istraživanja su pokazala da klinički fenotip i ozbiljnost CAKUT-a može značajno varirati između pacijenata iz različitih ili čak istih porodica koje nose istu mutaciju, što je navelo na formiranje hipoteze o oligogenom modelu nasleđivanja.

Godine 1995. otkriven je prvi defekt u jednom genu koji može izazvati CAKUT. U pitanju je delecija koja menja okvir čitanja u genu *PAX2* u porodici sa kolobomom optičkog nerva, bubrežnom hipoplazijom i VUR-om (Sanyanusin i sar., 1995). Drugi gen asociран sa CAKUT-om je bio *HNF1B*, u kome je otkrivena heterozigotna mutacija kod dvoje dece sa renalnim cistama i sindromom dijabetesa (Horikawa i sar., 1997). Oba ova pronalaska su validirana u više studija

na većim kohortama pacijenata, i potvrđeno je da mutacije u *PAX2* i *HNF1B* genu predstavljaju važan uzrok sindromskog i sporadičnog CAKUT-a. Procenjeno je da defekti u ovim genima opisuju 15% slučajeva CAKUT-a, što ih je učinilo prvim i najvažnijim genima za skrining u dijagnostičke svrhe. Mutacije u *PAX2* genu su najčešće asocirane sa bubrežnim displazijama i hipoplazijama dok su mutacije u *HNF1B* najčešće asocirane sa policističnim bubrezima (Weber i sar., 2006; Thomas i sar., 2011; Madariaga i sar., 2013).

Usledile su studije u kojima su skriningom gena kandidata identifikovane mutacije u heterozigotnom stanju kod 6-20% pacijenata sa CAKUT-om (^bNicolaou i sar., 2015). Do sada, mutacije su opisane u velikom broju gena, uključujući *BMP7*, *CHD1L*, *CDC5L*, *EYA1*, *GATA3*, *RET*, *ROBO2*, *SALL1*, *SIX2*, *SIX5*, *FRAS1*, *FREM2* i *DSTYK* (Weber i sar., 2006; Hwang i sar., 2014; Saisawat i sar., 2012; Sanna-Cherchi i sar., 2013; Kohl i sar., 2014). Većina opisanih gena predstavlja ključne faktore u razviću bubrega i urinarnog trakta. Međutim, u velikom broju studija nedostaju ko-segregacione analize, rigorozne statističke metode i funkcionalne validacije koje bi podržale kauzativnu tvrdnju ili asocijaciju sa CAKUT-om. Iz tog razloga je verovatno da je broj gena i varijanti koje imaju pravi patogeni efekat precenjen, a detekcija štetnih varijanti otkrivenih gena ne mora sama po sebi ukazivati na patogenost (^aNicolaou i sar., 2015). Naime, baze podataka sačinjene u velikim projektima sekvenciranja opšte populacije, kao što je npr. *Exome Aggregation Consortium* služe kao koristan referentni set varijanti i otkrivaju da opisane varijante gena koje rezultuju gubitkom funkcije, i prethodno su opisane da dovode do bolesti, takođe postoje i u opštoj populaciji. Iz tog razloga je sprovedena studija na najvećem broju gena do sada u CAKUT-u i otkriveno je da retke varijante prethodno izučavanih gena u CAKUT-u nose značajno manji rizik za nastanak bolesti i da je bolest kompleksnija nego što je očekivano (^aNicolaou i sar., 2015).

Iako je veliki broj gena zaduženih za upravljanje embrionalnim razvićem i funkcijom bubrega i urinarnog trakta već poznat (McMahon i sar., 2008; ^bNicolaou i sar., 2015), i dalje se malo zna o njihovim interakcijama u okviru kompleksnih molekularnih mreža prilikom nastanka CAKUT-a (Uetani i Bouchard, 2009; Rumballe i sar., 2010; Renkema i sar., 2014). Iz tog razloga je u cilju otključavanja

genetičke kompleksnosti bolesti važna integracija različitih molekularnih metoda i sistemski, bioinformatički pristup u analizi podataka velikog obima.

1.2. Određivanje ekspresije celokupnog genoma tehnologijom genskog ekspresionog čipa kao pristup u pronalaženju ključnih gena za nastanak bolesti

Transkriptomika je poslednjih godina postala veoma moćan pristup u istraživanju kako fizioloških odgovora na različite spoljašnje stimuluse, tako i različitih patoloških stanja. Za razliku od većine drugih metoda u molekularnoj genetici uz pomoć kojih je moguće analizirati jedan gen ili mali set gena, genski ekspresioni čip – GEČ (engl. *Genome-wide gene expression microarray*) omogućava pronalaženje potpuno novih i neočekivanih funkcionalnih uloga različitih gena. Potencijal ove metode je primenjiv u čitavom spektru naučnih istraživanja, kao što su: pronalaženje novih podtipova bolesti, razvoj novih dijagnostičkih pristupa, identifikacija mehanizama odgovora na lek, kao i izučavanje mehanizma nastanka i progresije bolesti.

Savremene tehnologije GEČ su dizajnirane da „pokriju“ više od 47 000 različitih, dobro okarakterisanih transkripata čoveka izvedenih iz baze referentnih sekvenci (engl. *National Centre for Biotechnology Information Reference Sequence – NCBI*). Iz tog razloga, ova tehnologija proizvodi, kao rezultat analize ekspresije celokupnog genoma, veliku količinu podataka koje je nemoguće interpretirati bez upotrebe modernih bioinformatičkih i statističkih metoda (Slonim i Yanai, 2009). Sa druge strane, ovaj obim podataka pruža mogućnosti da se pored određivanja diferencijalno eksprimiranih gena između različitih grupa uzoraka i njihovih potencijalnih interakcija u biološkim procesima i metaboličkim putevima, takođe može izvršiti i indirektno predviđanje aktivnosti različitih regulatora genske ekspresije (Baty i sar., 2013; Madden i sar., 2010; Arora i Simpson, 2008; Arora i sar., 2007).

1.3. Bioinformatički pristup u analizi ekspresije celokupnog genoma

Bioinformatika je interdisciplinarno naučno polje čiji je glavni zadatak razvoj metoda i softverskih alata za interpretaciju i razumevanje bioloških podataka. Ona sjedinjuje računarstvo i informatiku, statistiku, matematiku i inženjering u cilju proučavanja i procesuiranja ovih složenih podataka čiji je opseg i kompleksnost imaju tendenciju da sve više rastu. Bioinformatika kao termin se koristi za skup bioloških istraživanja koja koriste računarsko programiranje kao deo metodologije ali takođe i za specifične repetitivne (engl. *pipeline*) analize, koje se koriste bez izmene izvršnog algoritma, i naročito su zastupljene u genetici, genomics i transkriptomici. Pored analize podataka, bioinformatika nam pruža mogućnosti simulacije i predviđanja stanja i aktivnosti različitih bioloških komponenti pružajući biološkim istraživanjima još jednu, *in silico* dimenziju. Bioinformatička predikcija je svojom pojavom napravila veliki pomak u genetičkim istraživanjima jer otvara vrata složenim integracionim metodama koje povezuju više različitih tipova bioloških podataka i daju im smisao u ispitivanim slučajevima (Barnes, 2007).

Nauka vođena hipotezom je bila istorijski *modus operandi* poslednjih 200 godina. Međutim, zbog eksponencijalnog porasta količine genomičkih podataka dolazi do pomeranja prema nauci vođenoj pronalaskom. Ova promena će formirati osnovu za nove, preciznije hipoteze, koje bi poslužile kao temelj novim fokusiranim istraživanjima mnogih bolesti.

Ogromna količina generisanih podataka predstavlja samo početak revolucije u ovom polju nauke. Sledeći izazov je dodeliti smisao velikim listama identifikovanih gena i odrediti ključne faktore odgovorne za nastanak bolesti i potencijalne terapijske ciljeve (Huang i sar., 2009). Samim tim, u eri post-genomike, bioinformatička interpretacija velikih genskih listi izvedenih iz eksperimenata na GEČ-u predstavlja važnu komponentu u procesu razumevanja izučavanog biološkog fenomena.

1.4. MikroRNK

Evolucijom je kod eukariota nastalo nekoliko različitih tipova malih RNK u cilju regulacije genske ekspresije i eliminacije neželjenog genetičkog materijala (Ghildiyal i Zamore, 2009; Lee i sar., 1993). Mikro RNK (miRNK) pripadaju dominantnoj klasi malih RNK u većini somatskih tkiva, čineći grupu veoma važnih epigenetičkih faktora zaduženih za post-transkripcionu regulaciju genske ekspresije. Njihova uloga je ključna u regulaciji čitavog spektra bioloških procesa, kao što su proliferacija i diferencijacija ćelija, apoptoza, metabolizam i embrionalno razviće (Bartel, 2009; Krol i sar., 2010; Carthew i Sontheimer, 2009). Samim tim, poremećaj aktivnosti miRNK može biti jedan od važnih faktora u patogenezi mnogih bolesti, kao što su kancer, metabolička oboljenja i različite urođene, razvojne anomalije (Krol i sar., 2010; Carthew i Sontheimer, 2009).

Nomenklatura miRNK i njihovih gena nije u potpunosti konzistentna. Naime, miRNK geni pronađeni u ranijim genetičkim studijama na nematodama su nazvani po ispitivanom fenotipu (*lin-4*, *let-7* i *lsy-6*), dok većina miRNK pronađenih metodama kloniranja i sekvenciranja dobijaju numerička imena (npr. *mir-125*). Geni koji kodiraju sestrinske miRNK, čije se zrele forme razlikuju u jednom ili dva nukleotida, imaju slovo u sufiksu (npr. *mir-125a* i *mir-125b*). Ako identična miRNK potiče sa više različitih lokusa, imena tih lokusa su obeležena numeričkim sufiksima (npr. *mir-125b-1* i *mir-125b-2*). Svaki miRNK lokus proizvodi dve zrele miRNK, jednu sa 5' lanca a drugu sa 3' lanca prekursora (npr. miR-125a-5p i miR-125a-3p). Međutim, dve komplementarne miRNK sa istog lokusa nisu podjednako zastupljene u ćeliji. Manje zastupljena forma se po nomenklaturi obeležava sufiksom „*“ (Kozomara i Griffiths-Jones, 2011; Ha i Kim, 2014). Kod mnogih vrsta, uključujući i čoveka, postoji mnogo miRNK lokusa sa sličnim sekvencama, nastalih najčešće duplikacijama gena (Hertel i sar., 2006; Berezikov, 2011). Klasifikaciona pravila nisu još uvek ujedinjena, ali se generalno podrazumeva da miRNK sa identičnim sekvencama od 2. do 8. nukleotida zrele miRNK pripadaju istoj familiji (Bartel, 2009).

Geni koji kodiraju miRNK pripadaju jednoj od najbrojnijih genskih familija (Griffiths-Jones i sar., 2008). Dosadašnje studije su pokazale da miRNK regulišu

ekspresiju više od 60% protein kodirajućih gena (Kozomara i Griffiths-Jones, 2014). Samim tim, poremećaj u njihovoj ekspresiji može dovesti do teških urođenih oboljenja i morfoloških anomalija.

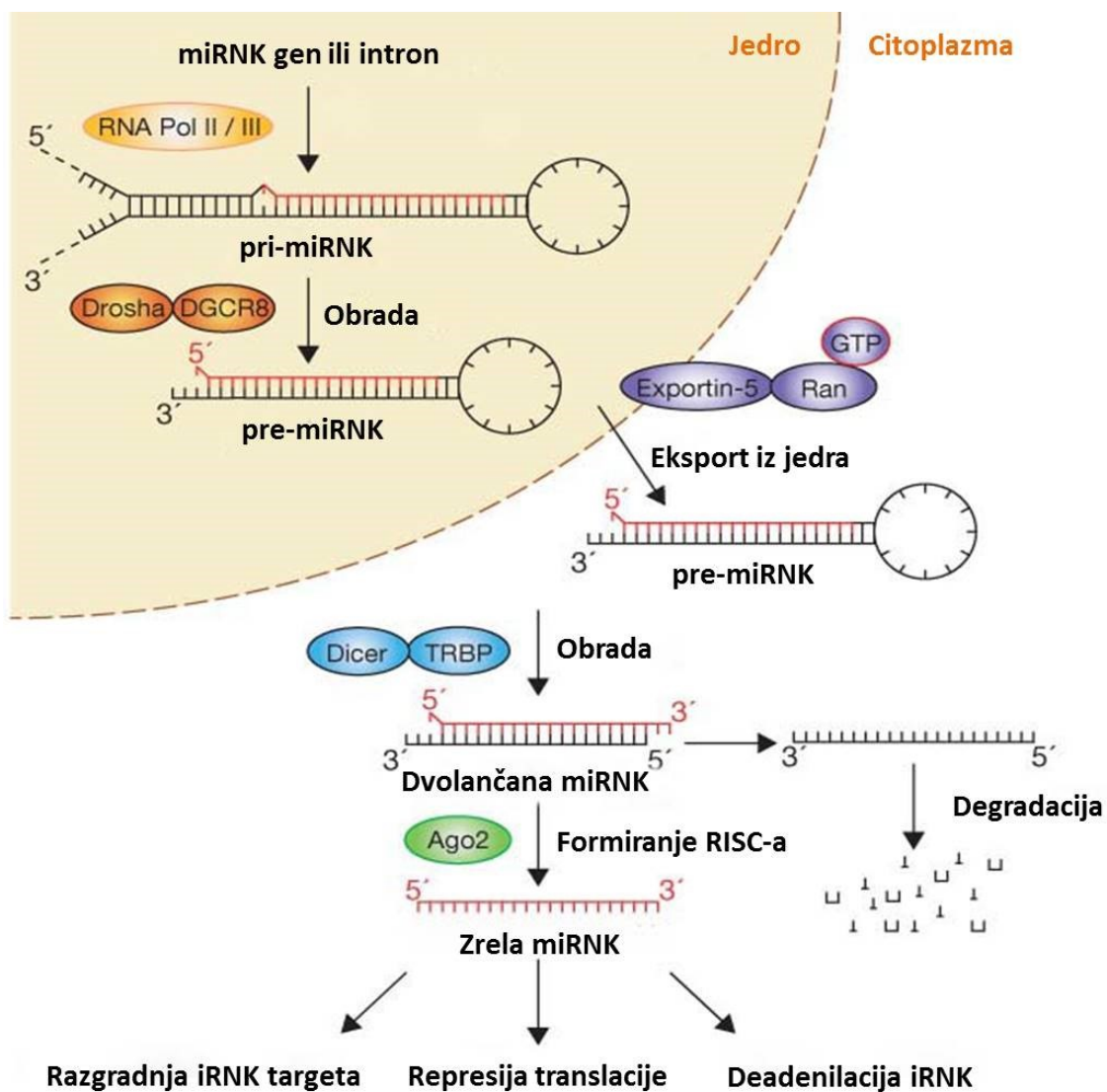
1.4.1. Biogeneza i funkcija miRNK

1.4.1.1. Biogeneza miRNK

Sekvence miRNK su lokalizovane u različitim genomskim kontekstima. Kod čoveka, većina kanonskih miRNK je kodirano intronima protein kodirajućih i nekodirajućih transkripata, dok je manji broj miRNK kodiran egzonima nekodirajućih transkripata (Ha i Kim, 2014). Često je nekoliko miRNK lokusa u blizini, čineći policistronsku transkripcionu jedinicu (Lee i sar., 2002). I pored toga što je lokacija velikog broja miRNK otkrivena, precizne lokacije promotora za većinu miRNK gena još uvek nisu mapirane (Ha i Kim, 2014). Poznato je da miRNK geni u intronima protein kodirajućih gena (mirtroni) dele promotor sa genom „domaćinom“. Međutim, pokazano je da miRNK geni često imaju više mesta početka transkripcije (Ozsolak i sar., 2008) i da intronske miRNK ponekad mogu imati sopstvene promotore, nezavisne od promotora gena „domaćina“ (Monteys i sar., 2010), čineći regulaciju ekspresije ovih malih RNK veoma kompleksnom.

Transkripcija primarnog miRNK transkripta (pri-miRNK) sa miRNK gena (Slika U2) se uglavnom vrši RNK polimerazom II (pol II) (Lee i sar., 2004; Cai i sar., 2004) koja omogućava složenu kontrolu ekspresije miRNK sličnu ostalim protein-kodirajućim genima (Kim, 2005). Za pri-miRNK je karakteristično da su često duge nekoliko kilobaza i da sadrže strukturu ukosnice. RNK-aza tip III enzim, Drosha, formira sa kofaktorom DGCR8 mikroprocesor kompleks i vrši endonukleazno isecanje strukture ukosnice, oslobađajući prekursor miRNK (pre-miRNK) dužine od oko 70 nukleotida (Lee i sar., 2003). Pošto je proces obrade miRNK kompartmentalizovan i podeljen na jedarnu i citoplazmatsku obradu (Slika U2), eksport pre-miRNK iz jedra je od presudnog značaja za biogenezu miRNK. Pre-miRNK biva eksportovana u citoplazmu pomoću jedarnog transportnog receptora eksportin-5 (Lund i sar., 2004; Bohnsack i sar., 2004; Yi i sar., 2003). Da bi uspešan transport kroz proteinski kompleks jedarne pore bio moguć, neophodan je

kofaktor jedarnog transportnog receptora Ran-GTP. Nakon prolaska kompleksa (pre-miRNK)-(eksportin-5)-(Ran-GTP) kroz jedarnu poru dolazi do hidrolize GTP u GDP i oslobađanja pre-miRNK u citoplazmu. Takođe, pretpostavlja se da exportin-5, pored funkcije transportovanja, dodatno stabilizuje pre-miRNK. Naime, eksperimentalno iscrpljivanje ovog receptora ne rezultuje akumulacijom pre-miRNK u jedru što ukazuje na njenu brzu degradaciju u slučaju da ne dođe do asocijacije sa exportin-5 receptorom (Yi i sar., 2003). Nakon eksportovanja iz jedra, pre-miRNK podležu obradi u citoplazmi RNK-aza tip III enzimom Dicer. Rezultat ove obrade je dvolančana miRNK dužine od oko 22bp (Hutvagner i sar., 2001; Ketting i sar., 2001; Kim, 2005). Od svakog od ova dva lanca će nastati po jedna zrela miRNK koje se obeležavaju sufiksima 3p i 5p u zavisnosti od kog je kraja ukosnice taj lanac potekao (5' ili 3'). Obično je jedan lanac zrele miRNK (engl. *guide*) zastupljeniji (96-99% ukupne zastupljenosti obe forme) i biološki aktivniji od drugog lanca (engl. *passenger*) poreklom sa istog lokusa (Ha i Kim, 2014). Selekcija *guide* lanca se vrši nakon ATP zavisne asocijacije dvolančane miRNK sa AGO 1-4 proteinima i formiranja RISC kompleksa (engl. *RNA Induced Silencing Complex*), najverovatnije na osnovu termodinamičke stabilnosti krajeva ovog RNK dupleksa (Kawamata i sar., 2009; Schwarz i sar., 2003). Lanac *passenger* brzo degraduje nakon oslobađanja iz RISC-a, što rezultuje velikoj razlici u koncentraciji između biološki više i manje aktivnog lanca jedne miRNK (Ha i Kim, 2014). Međutim selekcija lanaca nije uvek striktna jer u nekim slučajevima nefavorizovani lanac može biti selektovan sa različitom učestalošću. Ovaj alternativni vid selekcije je objašnjen varijacijama u obradi iste pri-miRNK Drosha enzimom, menjajući relativnu termodinamičku stabilnost krajeva dvolančane miRNK (Wu i sar., 2009).



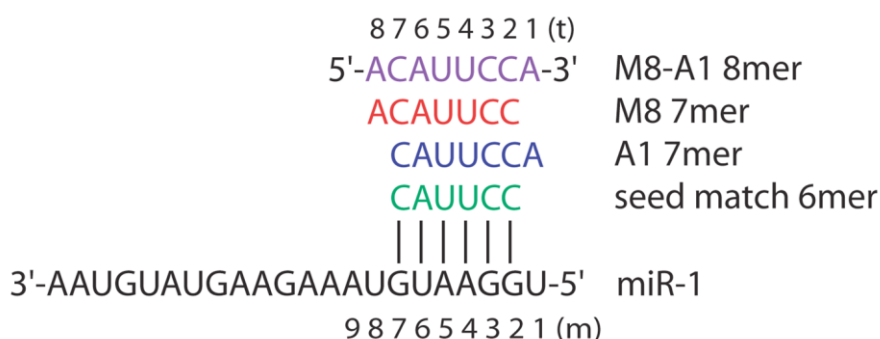
Slika U2. Biogeneza i kanonska funkcija miRNK. Preuzeto i adaptirano od Winter i sar., 2009.

1.4.1.2. Uloga miRNK u regulaciji geneske ekspresije

U post-transkripcionoj regulaciji genske ekspresije zasnovanoj na RNK interferenciji, miRNK inkorporirane u RISC kompleksu imaju ulogu u prepoznavanju ciljane (*target*) iRNK dok AGO proteini imaju efektornu ulogu ili regrutuju faktore koji indukuju represiju translacije, deadenilaciju ciljane iRNK i razgradnju ciljane iRNK (Huntzinger i Izaurralde, 2011). Vezujuća mesta miRNK su najčešće locirana u 3' netranslatirajućem regionu (engl. *3' Untranslated Region - 3'UTR*) iRNK (Bartel i sar., 2009). Potpuna komplementarnost miRNK sekvence sa vezujućim mestom na iRNK dovodi do isecanja iRNK AGO2 proteinom, koji jedini od AGO proteina ima endonukleaznu funkciju u RISC kompleksu (Miyoshi i sar., 2005; Diederichs i Haber, 2007; Hutvagner i Zamore, 2002; Liu i sar., 2004). Međutim, ovaj mehanizam se veoma retko javlja kod čoveka jer se većina interakcija miRNK sa iRNK ostvaruje formiranjem nekomplementarnih ispupčenja na sredini miRNK što dovodi do prevencije endonukleaznog isecanja iRNK uz pomoć AGO2 (Bartel, 2009).

Za uspešno prepoznavanje vezujućih mesta na iRNK presudan je domen na 5' kraju miRNK, koji se proteže od 2. do 8. nukleotida (engl. *seed*) (Slika U3). Kod čoveka je za većinu miRNK vezujućih mesta komplementarnost ograničena samo na *seed* sekvencu, ali je u nekim slučajevima i 3' kraj miRNK važan za stabilizaciju interakcije sa iRNK, posebno deo između 13. i 16. nukleotida (Brennecke i sar., 2005; Grimson i sar., 2007). U početku se mislilo da opisani način interakcije miRNK sa iRNK kod čoveka, koji je okarakterisan obaveznom i potpunom komplementarnošću *seed* regiona sa ciljnim transkriptom i parcijalnom komplementarnošću preostalog dela interagujućih RNK, dovodi do represije translacije proteina blokadom elongacije, bez uticaja na nivo iRNK (Wightman i sar., 1993; Olsen i Ambros, 1999). Iako su detalji mehanizama posttranskripcione regulacije genske ekspresije od strane miRNK još uvek nepotpuno objašnjeni, novija istraživanja su pokazala da je kod sisara glavni rezultat aktivnosti miRNK destabilizacija i smanjenje nivoa ciljane iRNK (Guo i sar., 2010). miRNK čoveka mogu regulisati gensku ekspresiju i na druge načine: deadenilacijom iRNK (Wu i sar., 2006; Behm-Ansmant i sar., 2006; Giraldez i sar., 2006; Eulalio i sar., 2007) i

blokadom inicijacije transkripcije (Pillai i sar., 2005; Humphreys i sar., 2005; Mathonnet i sar., 2007; Chendrimada i sar., 2007) koje su praćene degradacijom iRNK u P telima, kao i indukcijom proteolize peptida u nastajanju (Nottrott i sar., 2006). Ovaj tip aktivnosti miRNK nam pruža mogućnost da, iako još uvek ne poznajemo mehanizme u potpunosti, možemo na osnovu kompleksnih predikcionih, statističkih i simulacionih bioinformatičkih metoda povezati različite miRNK sa određenim profilima genske ekspresije na nivou iRNK, a samim tim i sa različitim stanjima i oboljenjima organizma koje ti ekspresioni profili karakterišu.



Slika U3. Tipovi sparivanja *seed* regiona sa ciljnom sekvencom na iRNK. Preuzeto od Friedman i sar., 2009.

1.4.2. miRNK kao biomarker i terapeutik

Otkriće miRNK od strane Viktora Ambrosa i kolega Rozalind Li i Ronde Fajnbbaum (Lee i sar, 1993) uvodi revoluciju u polju bioloških i biomedicinskih nauka otvorivši puteve važnim konceptualnim i tehnološkim inovacijama. Jedinствене hemijske i biološke karakteristike miRNK čine ove male RNK atraktivnim kandidatima za izučavanje u različitim oboljenjima. Pojedinačne miRNK mogu regulisati nivoe ekspresije stotina ciljnih gena, koji mogu učestvovati u različitim signalnim putevima i biološkim procesima. Njihova ekspresija je čvrsto povezana sa njihovom funkcijom pa bi određivanje funkcija pojedinačnih miRNK moglo da nadje primenu i u dijagnostičke i terapijske svrhe. Naime, svaka promena ekspresije miRNK može uticati na ekspresiju većeg broja iRNK iz različitih molekularnih mreža. Iz tog razloga, upotreba nivoa ekspresije ključnih miRNK kao biomarkera u dijagnozi bolesti pokazuje veliki potencijal. Takođe, pored

dijagnostike, miRNK imaju potencijal da se koriste kao molekularni targeti (Gomez i sar., 2015) a njihove mimike kao terapeutici (Kasinski i sar., 2015), gde bi se kontrolisanjem nivoa ekspresije miRNK regulisao čitav spektar bioloških procesa, omogućavajući na taj način primenu u personalizovanoj medicini.

1.5. miRNK u CAKUT-u

Uprkos rastućem znanju o različitim miRNK eksprimiranim u bubregu i urinarnom traktu, uloga pojedinih miRNK u CAKUT-u je još uvek u velikoj meri nerasvetljena, a količina podataka o funkciji različitih miRNK u razviću i funkciji ovog organskog sistema kod čoveka ograničena i nedovoljna (Marrone i sar., 2014). Takođe se pretpostavlja da miRNK mogu biti odgovorne ne samo za nastanak, već i za fenotipsku varijabilnost karakterističnu za CAKUT (Marrone i sar., 2014).

Eksperimenti nespecifičnog utišavanja miRNK na različitim morfološkim nivoima bubrega i urinarnog trakta pokazali su esencijalnost miRNK u svim fiziološkim procesima i nastanak patoloških promena usled gubitka ovih važnih mikrokoordinatora. Pokazano je da gubitak miRNK u bubrežnim tubulama ima snažan negativan uticaj na sazrevanje bubrega i uslovljava razvoj hidrouretera i hidronefroze kao i tubularnih i glomerularnih cista (Patel i sar., 2012). Jukstaglomerularne ćelije bez miRNK prestaju da luče renin, koji je jedan od najvažnijih regulatora homeostaze telesnih tečnosti i bez koga je nemoguće pravilno funkcionisanje vaskularnog sistema (Sequeira-Lopez i sar., 2010). Inhibicija zrelih miRNK u unipotentnim stem ćelijama nefrona povećava apoptozu i ima izražen uticaj na njihovo preživljavanje (Ho i sar., 2011, Nagalakshmi i sar., 2011). Takođe, poremećaj biogeneze miRNK u bubrežnim tubulama, zajedno sa delom ureterovog pupoljka, dovodi do formiranja simptoma CAKUT-a i opstrukcija na UPS (Bartram i sar., 2013). Međutim, pored toga što je dokazano da su miRNK veoma važni faktori u razviću bubrega, eksperimenti utišavanja miRNK u podocitama su pokazali da iako u ovim ćelijama gubitak miRNK nema velikog uticaja na regulatorne molekularne puteve razvića, one utiču na njihovu fiziologiju, te je gubitak miRNK rezultovao jakom proteinurijom i tubularnim i glomerularnim povredama uključujući kolaps kapilara glomerula (Ho i sar., 2008).

Sva pomenuta istraživanja podržavaju stav da je razvoj urinarnog sistema strogo kontrolisan proces koji u svim fazama zahteva koordinaciju velikog broja miRNK. Naime, poremećaj u ekspresiji miRNK ili u interakciji između miRNK i iRNK gena odgovornih za razvoj bubrega i urinarnog trakta može rezultovati čitavim spektrom ekspresionih profila ovih gena što pored nastanka urođenih anomalija može uticati i na težinu njihovog fenotipa. Međutim, iako je dokazana ključna uloga miRNK u razviću bubrega i urinarnog trakta, količina informacija o miRNK koje bi mogle specifično da doprinesu nastanku CAKUT-a je mala i često izvedena iz ispitivanja drugih bubrežnih oboljenja koja se ne svrstavaju u urođene anomalije. Takođe je važno da se pored razvojne, uzme u obzir i fiziološka komponenta, jer teška oboljenja urinarnog sistema mogu biti rezultat poremećaja fizioloških procesa usled izmenjene aktivnosti određenih miRNK. Pronalaženje ključnih miRNK, odgovornih za nastanak CAKUT-a, kao i njihovih regulatornih mreža, omogućilo bi dalji razvoj potencijalne primene ovih malih RNK kao terapeutika za prevenciju ili kao specifičnih biomarkera za ranu dijagnozu ovih urođenih anomalija.

1.6. Bioinformatički pristup u izučavanju biologije miRNK

1.6.1 miRBase

miRBase je javna baza svih objavljenih miRNK sekvenci i asociranih anotacija. Od njenog osnivanja 2002. godine, miRBase je dizajnirana da bude fokusirani resurs koji će dati značajan doprinos rapidno rastućem polju miRNK. Autori su imali primarni cilj da formiraju konzistentan način imenovanja novootkrivenih miRNK, kao i da arhiviraju sve opisane miRNK sekvence. Takođe, današnje verzije ove baze (Release 21: June 2014) karakteriše inkorporacija funkcionalnih anotacija kao i baza validiranih interakcija između miRNK i iRNK. miRBase trenutno sadrži sekvence i anotaciju za 1881 prekursora i 2588 okarakterisanih zrelih miRNK čoveka (Kozomara i Griffiths-Jones, 2011; Griffiths-Jones i sar., 2008), mada funkcionalni značaj mnogih anotacija još uvek nije determinisan (Chiang i sar., 2010; Kozomara i Griffiths-Jones, 2014). Zbog sve većeg broja okarakterisanih miRNK nakon uvođenja tehnologije sekvenciranja

kratkim RNK (Kozomara i Griffiths-Jones, 2011) i zbog stalnih inovacija u arhitekturi baze, miRBase postaje osnova algoritama za predikciju miRNK ciljnih gena.

1.6.2. Algoritmi za predikciju miRNK vezujućih mesta

Otkriće izobilja miRNK kod višćelijskih organizama postavilo je mnoštvo pitanja, uključujući, možda i najintragantnije: koja je uloga ovih malih nekodirajućih RNK u ćeliji? Ključ za odgovor na ovo pitanje bi bio pronalazak njihovih ciljnih iRNK, a samim tim i ciljnih gena čiju ekspresiju kontrolišu. Tada je nastao i veliki izazov: osmisliti bioinformatički algoritam koji bi vršio pretragu na nivou celokupnog genoma i predviđao vezujuća mesta svih miRNK uz što manji broj pogrešnih predviđanja (Bartel, 2009).

U početku, razvoj algoritama koji bi pronalazili miRNK vezujuća mesta na osnovu sekvenci miRNK i referentnih sekvenci 3'UTR iRNK nailazi na veliki problem zbog velikog broja pozitivnih rezultata koje je bilo neophodno filtrirati u cilju odstranjivanja lažno pozitivnih podataka (Bartel, 2009). Tek je sa otkrićem visoke evolucione konzervacije 5' kraja miRNK (Lim i sar., 2003) došlo do ključnog metodološkog napretka u razvoju ovih algoritama. Naime, određivanjem stepena evolucione konzervacije interakcije *seed* regiona miRNK sa vezujućim mestom u 3'UTR na iRNK između srodnih vrsta, omogućeno je pronalaženje evoluciono favorizovanih potencijalnih vezujućih mesta i njihovo razlikovanje od sekvenci koje bi u najranijim verzijama ovih predikcionih algoritama bile jednako posmatrane (Lewis i sar., 2003). Ideja o evolucionoj konzervaciji primenjena je takođe i u analizi promotorskih regiona miRNK i njihovih ciljnih gena (Fujiwara i Yada, 2013), kao i u kolokalizaciji nezavisno transkribovanih miRNK i okolnih protein kodirajućih gena (Ohler i sar., 2004). Samim tim, mogućnost inkorporacije analize konzerviranih elemenata dovodi do velikog pomaka u predikciji miRNK ciljnih gena.

Pored različitog stepena komplementarnosti između miRNK i njihovih vezujućih mesta i evolucione konzerviranosti različitih miRNK i genskih elemenata, u skorije vreme se u predikciju miRNK ciljnih gena uvode i drugi parametri kao što

su, slobodna energija (Yue i sar., 2009), dostupnost mesta vezivanja (Long i sar., 2007), zastupljenost vezujućih mesta (Garcia i sar., 2011), lokalni AU sadržaj oko vezujućeg mesta (Friedman i sar., 2009; Betel i sar., 2010) i efekat pozicije interakcije (Grimson i sar., 2007).

Iako danas postoji veliki broj predikcionih algoritama koji koriste različite kombinacije navedenih pristupa, još uvek ne postoji idealan algoritam za predikciju miRNK vezujućih mesta. Razlog tome je nemogućnost da se sve do sada razvijene analize koje utiču na predikciju, posebno kod sisarskih vrsta, inkorporiraju u jedinstven predikcioni algoritam (Bartel i sar., 2009). Samim tim, algoritme za predikciju miRNK vezujućih mesta pre treba posmatrati kao komplementarne nego kao redundantne. Pošto se svakodnevno dešifruje ogromna količina genomičkih informacija, nezaobilazno dolazi do uskog grla između bioinformatičke predikcije i *in vitro* i *in vivo* validacije predviđenih interakcija. Zato se u današnje vreme sve više javlja potreba za integracijom različitih algoritama za predikciju miRNK vezujućih mesta u cilju određivanja prioriternih interakcija i redukcije pogrešnih predikcija i nepotrebnih validacionih eksperimenata (Shirdel i sar., 2011). Kolike su ambicije naučnika i potrebe da se otkriju sva vezujuća mesta miRNK i na taj način rasvetle mnoge zagonetke o funkciji ovih mikrokoordinatora pokazuju i pokušaji razvoja mašinskog učenja kombinacije predikcija (Pio i sar., 2014), što čak zadire u domen veštačke inteligencije.

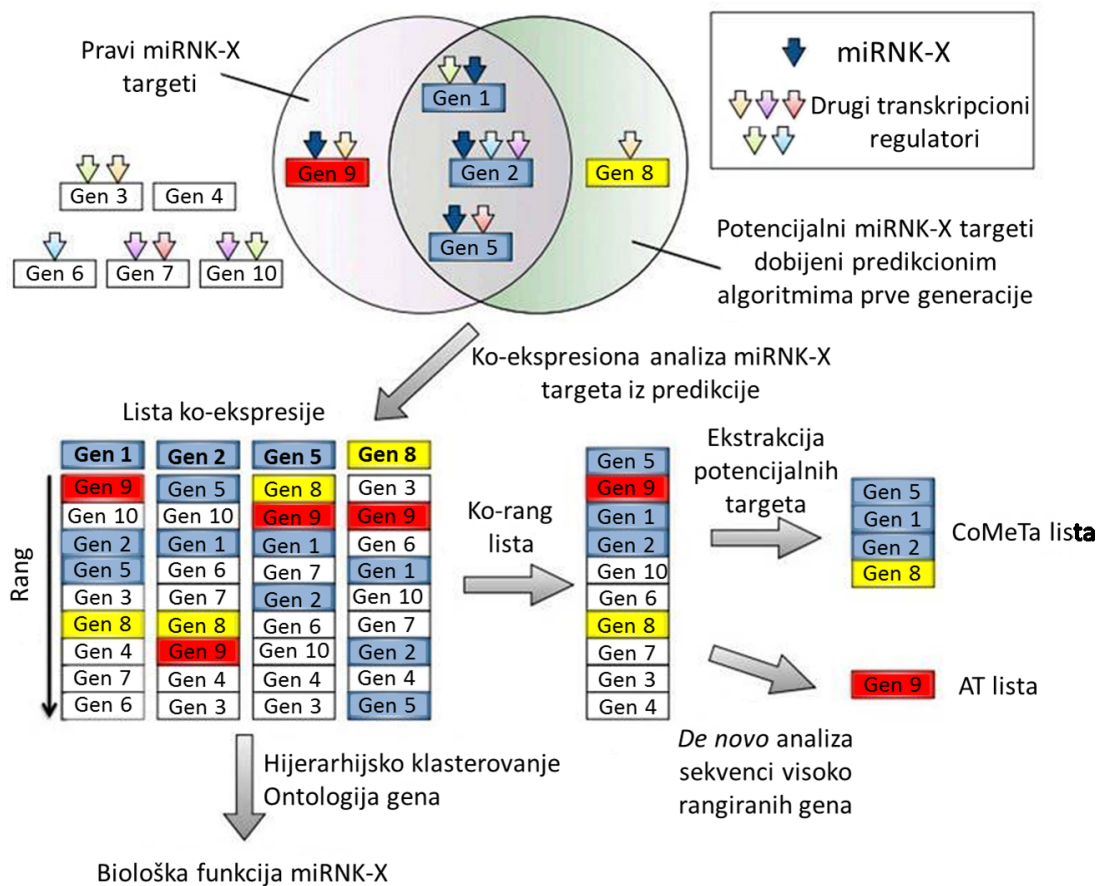
1.6.2.1. Ko-ekspresiona meta analiza miRNK ciljnih gena

Višedecenijske molekularne studije o regulatorima transkripcije su otkrile da je njihova aktivnost u velikoj meri kombinatorijalna. Aktivacija ili represija genske ekspresije od strane ovih faktora strogo zavisi od hromatinskog mikrookruženja, što može biti efekat mnoštva činilaca, kao što je tip ćelije i vrste internih i eksternih stimulusa. Samim tim, jedna od najznačajnijih karakteristika transkripcionih regulatora je da oni mogu aktivirati ili utišavati gensku ekspresiju, ili čak izmeniti specifičnost vezivanja na osnovu dinamičkih interakcija sa drugim transkripcionim faktorima i koaktivatorima. Kombinatorijalni efekat značajno povećava kompleksnost mreža genske regulacije od strane transkripcionih

regulatora kao i napore neophodne za njihovo izučavanje (Gennarino i sar., 2012). Sa druge strane, dosadašnji podaci pokazuju da miRNK nemaju istu kombinatorijalnu logiku kao transkripcioni regulatori, već pre sinergističku i aditivnu u slučajevima kada se više miRNK vezuje za istu iRNK (Tsang i sar., 2010). Takva odlika miRNK aktivnosti omogućila je izučavanje mreža regulacije genske ekspresije od strane miRNK fokusiranjem na ekspresione odnose između miRNK ciljnih gena (Gennarino i sar., 2012).

Ko-ekspresiona meta analiza miRNK ciljnih gena (engl. *Co-expression Meta-analysis of miR Target genes – CoMeTa*) je prva metoda koja integriše računarsku i ekspresionu analizu, oslanjajući se isključivo na setove podataka o transkriptomima dostupnim u javnim bazama (Slika U4) (Gennarino i sar., 2012). Ko-ekspresionom meta analizom podataka o genskoj ekspresiji poreklom od stotina ćelijskih sistema i većeg broja različitih tkiva izvršeno je rangiranje miRNK ciljnih gena na osnovu stepena njihove koekspresije. Na ovaj način je izvršeno filtriranje postojećih rezultata drugih predikcionih algoritama, ali je takođe otkriven i veliki broj novih pravih ciljnih gena koje su predikcioni algoritmi označavali kao negativan rezultat. Koekspresionom analizom COOL, (engl. *CO-Operational Level*), je omogućena i predikcija funkcionalnih puteva miRNK, čime su velikom broju analiziranih miRNK dodeljena biološka svojstva. CoMeTa analizom je pored novih miRNK vezujućih mesta otkriveno postojanje grupa miRNK koje dele veći deo asociраних ciljnih gena. Na ovaj način su formirane miRNK zajednice (engl. *miRNA Communities - miRCos*) čiji članovi potencijalno mogu biti uključeni u sinergističku modulaciju grupa gena koji regulišu slične procese (Gennarino i sar., 2012).

CoMeTa metoda, zajedno sa dodatnim analizama miRCos i COOL, uvodi novitete u predikciju miRNK vezujućih mesta i funkcionalnu analizu pojedinačnih miRNK predviđanjem miRNK vezujućih mesta isključivo iz eksperimentalnih podataka i funkcionalnom anotacijom dobijenih setova podataka. Zato je neophodno da se u buduće eksperimente, pored osnovnih predikcionih algoritama, uvrsti i inovativna CoMeTa u cilju dobijanja što većeg broja pravih pozitivnih rezultatata.



Slika U4. Ko-ekspresiona meta analiza miRNK ciljnih gena. Preuzeto i adaptirano od Gennarino i sar., 2012.

1.6.3. Upotreba ko-inercione analize u asocijaciji miRNK sa različitim stanjima i oboljenjima

Kako pronaći pravu miRNK asociranu sa oboljenjem u moru interakcija gdje svaka miRNK reguliše stotine gena, a predikcioni algoritmi, koliko god da su savremeni, još uvek imaju prostora za dalje usavršavanje? Jedan od načina je primena ko-inercione analize (engl. *Co-Inertia Analysis - CIA*) u kombinaciji sa analizom asimetrične korespondencije (engl. *Non Symmetric Correspondence Analysis - NSC*) i analizom između grupa (engl. *Between Group Analysis - BGA*). Ova integrativna metoda povezuje podatke o genskoj ekspresiji sa GEČ i predikcije vezujućih mesta različitih miRNK iz više predikcionih algoritama u cilju asocijacije aktivnosti specifičnih miRNK sa karakterističnim ekspresionim profilima u različitim stanjima i bolestima (Madden i sar., 2010). Za analizu nije potrebno prethodno filtriranje podataka o genskoj ekspresiji kao kod sličnih analiza. Pogodnost CIA se takođe ogleda i u vizuelizaciji kompleksnih višedimenzionalnih podataka pomoću prostih dvodimenzionalnih dijagrama. Bioinformatički potencijal CIA je do sada iskorišćen za determinaciju miRNK karakterističnih za nastanak i progresiju kancera (Mulrane i sar., 2012) i miRNK specifičnih za određene vrste tkiva (Madden i sar., 2010). Iz tog razloga, CIA predstavlja veoma moćno bioinformatičko oruđe koje u kombinaciji sa eksperimentalnim podacima o genskoj ekspresiji celokupnog genoma može značajno pomoći u istraživanju nastanka i razvoja urođenih anomalija bubrega i urinarnog trakta i pronalaženju potencijalnih miRNK biomarkera ove bolesti.

2. Hipoteza i ciljevi

U ovoj molekularno-genetičkoj analizi u okviru bubrežno-urinarnog sistema čoveka postavljena je sledeća hipoteza: ako je razviće i normalna funkcija bubrega i urinarnog trakta genetički strogo koordinisan proces u kome učestvuje veliki broj različitih signalnih, regulatornih i metaboličkih puteva, tada ekspresioni profil ključnih gena u tkivu uretera kod dece sa urođenim anomalijama bubrega i urinarnog trakta (engl. CAKUT) treba da se razlikuje na nivou iRNK od ekspresionog profila kontrolnog, zdravog tkiva bez ovog oboljenja prilikom određivanja ekspresije gena celokupnog genoma. Deo hipoteze čini i pretpostavka da je promena ekspresije gena delom izazvana i izmenjenom aktivnošću određenih miRNK i da bi se na osnovu razlike u ekspresionom profilu celokupnog genoma u obolelom i zdravom tkivu uretera i predikcija vezujućih mesta svih poznatih miRNK, moglo zaključiti koje bi miRNK mogle biti asocirane sa CAKUT-om.

Potvrda ove hipoteze ukazala bi na ključne gene, biološke procese, molekularne funkcije, kanonske molekularne puteve, molekularne mreže i miRNK čija bi izmenjena aktivnost mogla dovesti do poremećaja u razvojnim i postnatalnim fiziološkim procesima urinarnog sistema. Na taj način bi se stvorila mogućnost za pronalaženje potencijalnih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera, kao i za razvoj novih terapijskih pristupa.

U ovoj analizi postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Identifikovati i uporediti profil ekspresije gena celokupnog genoma u tkivu uretera između dece sa CAKUT-om i zdravih kontrola i odrediti najznačajnije diferencijalno eksprimirane gene i ključne biološke procese, molekularne puteve i molekularne mreže kojima ti geni pripadaju.
2. Identifikovanim diferencijalno eksprimiranim genima iz glavnih molekularnih mreža analizirati biološki značajne funkcije u patofiziologiji CAKUT-a na osnovu informacija dostupnih u literaturi i odabrati nekoliko najznačajnijih gena za eksperimentalnu validaciju tih mreža.

3. Validirati ekspresiju odabranih gena na nezavisnom uzorku tkiva uretera i kvantifikovati i uporediti ekspresioni nivo tih gena kod dece sa CAKUT-om i zdravih kontrola.
4. Validirati novu metodu koja povezuje podatke o genskoj ekspresiji celokupnog genoma i predikcije vezujućih mesta različitih miRNK, iz pet predikcionih algoritama zasnovanih na sekvenci, a u cilju asocijacije specifičnih miRNK sa određenim fiziološkim ili patološkim stanjem (CIA).
5. Izvršiti integraciju predikcija miRNK vezujućih mesta iz CoMeTa algoritma u CIA metodu.
6. Identifikovati najspecifičnije miRNK koje su potencijalno asocirane sa karakterističnom ekspresijom celokupnog genoma u CAKUT-u kod dece primenjujući kombinaciju metoda iz ciljeva 4 i 5, i odabrati najznačajnije miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u CAKUT-u u odnosu na zdrave kontrole za eksperimentalnu validaciju.
7. Validirati odabrane najznačajnije miRNK na nezavisnom uzorku tkiva uretera dece sa CAKUT-om i zdravih kontrola, kvantifikovati ekspresione nivoe ukoliko postoje i odrediti koje biološke procese potencijalno regulišu.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorak

Za analizu tkivno specifične ekspresije gena celokupnog genoma i miRNK u CAKUT-u korišćeno je tkivo uretera pedijatrijskih pacijenata (n=55) koji su prema kliničkim i laboratorijskim podacima klasifikovani od strane urologa i nefrologa kao pacijenti sa urođenim anomalijama bubrega i urinarnog trakta (CAKUT). Dijagnostika je bazirana na ultrazvučnom pregledu pre i nakon rođenja, a potvrđivana intravenskom urografijom (IVU) i radioizotopskom renografijom (korišćenjem ^{99m}Tc-DTPA radiofarmaka). Refluks je dijagnostikovao mikcijskom cisto-uretrografijom (engl. *Voiding Cysto-Uretrography* - VCUG). Pacijenti uključeni u studiju su imali jedno ili više patoloških stanja okarakterisanih kao CAKUT: opstrukcija na ureteropelvičnom spoju (UPJO), opstruktivni megaureter (OMU), veziko-ureteralni refluks (VUR), valvula zadnje uretre (VZU) i bubrežna hipoplazija/displazija. Svim pacijentima uključenim u studiju je urađena korektivna hirurška intervencija na nivou uretera, u periodu između 2011. do 2015. godine na odeljenju za nefrologiju i urologiju Univerzitetske Dečje Klinike u Beogradu. Starost dece u trenutku operacije je bila od 0,1 do 6 godina.

Kao kontrolni uzorci uretera (n=19) korišćeni su uzorci dobijeni prilikom neophodnog odstranjivanja dela zdravih uretera adultnih donora bubrega tokom operacije transplantacije bubrega u periodu od 2011. do 2015. godine, na odeljenju za nefrologiju i urologiju Univerzitetske Dečje Klinike u Beogradu.

Univerzitetski Etički Istraživački Odbor je odobrio studiju. Informativni pristanak je dobijen od roditelja dece koja su podvrgnuta operaciji, kao i od donora bubrega. Svi učesnici studije su bili Kavkazijanci, srpske nacionalnosti.

Segmenti uretera su odstranjeni minimalnom manipulacijom i odmah nakon hirurške intervencije smešteni u rastvor RNAlater® (Ambion, Austin, SAD) koji čuva tkivnu RNK stabilizujući je i inaktivirajući ribonukleaze. Nakon odstranjivanja, uzorci uretera su odmah smešteni na -20°C do ekstrakcije totalne RNK.

U analizi ekspresije celokupnog genoma u tkivu uretera je obuhvaćeno 19 pacijenata sa dijagnostikovanim CAKUT-om i 7 zdravih kontrola. Validaciona analiza ekspresije gena *LCN2*, *PROM1*, *RASD1*, *SOSTDC1*, *INA* i *TAC3* je obuhvatala 32 pacijenta sa CAKUT-om od kojih je 22 bilo nezavisno od eksperimenta na GEČ i 15 kontrola od kojih je 9 bilo nezavisno od eksperimenta na GEČ.

U analizi ekspresije miRNK u tkivu uretera je uključeno 36 pacijenata sa dijagnostikovanim CAKUT-om i 7 zdravih kontrola.

Za validaciju CIA analize odabran je set podataka o genskoj ekspresiji celokupnog genoma u tkivu karotidnog plaka (Doring i sar., 2012) preuzet sa javne baze Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Barrett i sar., 2013). Podaci na GEO serveru su organizovani na osnovu pravila o minimalnim informacijama o GEČ eksperimentu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/MIAME.html>) i slobodni za preuzimanje i reprodukovanje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/disclaimer.html>). Ekspresioni profil celokupnog genoma je urađen na Affymetrix hgu133plus2 platformi. Klasifikacija uzoraka tkiva aterosklerotskog plaka je izvršena na osnovu kliničkih karakteristika: rane lezije – patološko zadebljanje i ksantom intime zida krvnog suda; uznapredovale lezije – aterom sa tankom ili zadebljalom fibroznom kapom. Uzorci su prikupljeni nakon smrti od strane Odeljenja za patologiju, Univerzitetski Medicinski centar u Mastrohtu, Holandija (Doring i sar., 2012).

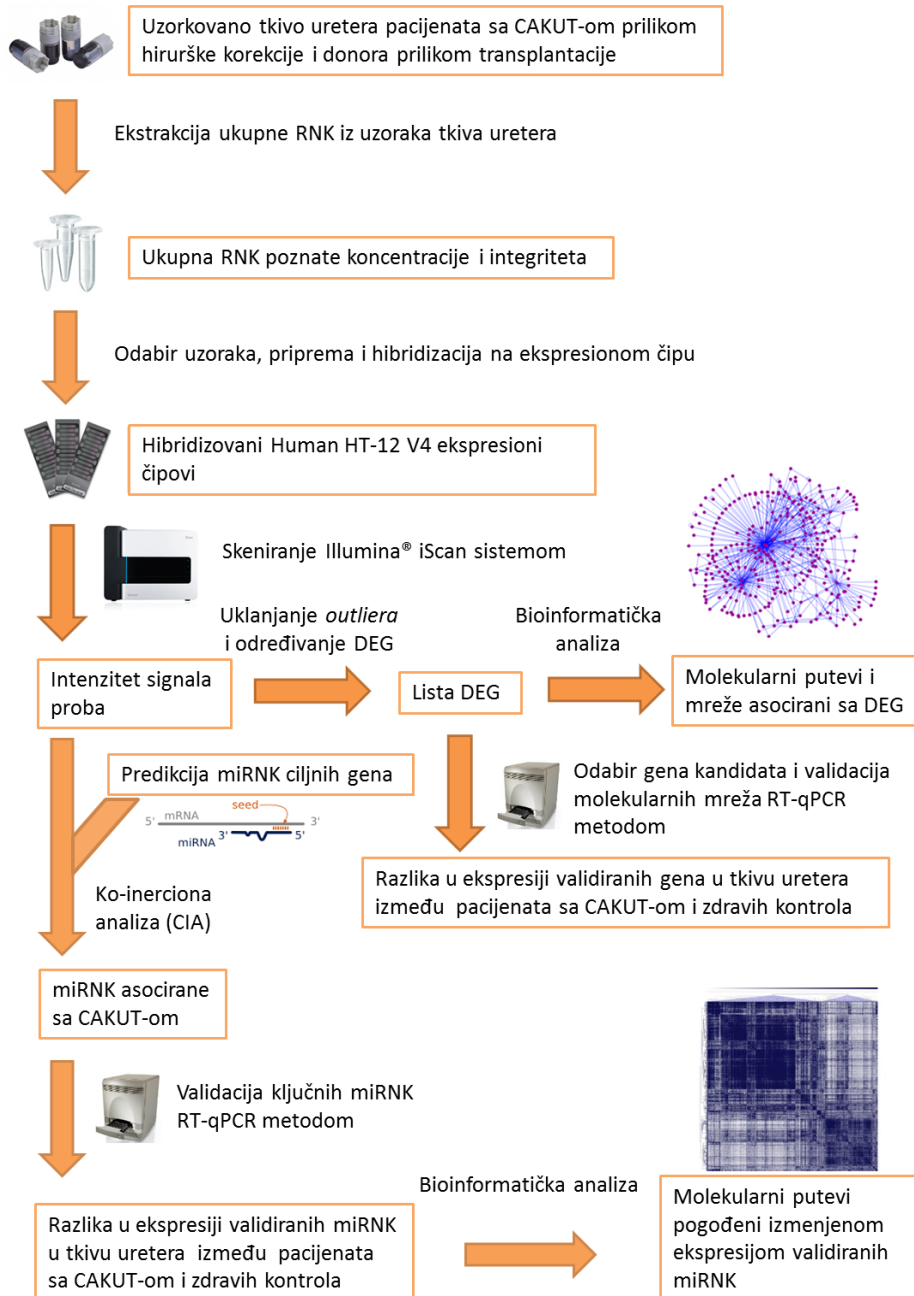
3.1.2. Aparatura

Prilikom izrade teze korišćena je sledeća aparatura:

- Spektrofotometar BioSpec-nano (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan)
- 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, SAD)
- PCR aparat: ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, SAD)
- iScan Microarray skener (Illumina, San Diego, SAD)
- Real-time PCR sistem: Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, SAD)

3.2. Metode

Dizajn studije i korišćena metodologija u određivanju ključnih gena i miRNK za nastanak CAKUT-a kod čoveka su predstavljeni šematski (Slika M1).



Slika M1. Šematski prikaz dizajna studije identifikacije ključnih gena i miRNK za nastanak CAKUT-a kod čoveka

3.2.1. Ekstrakcija ukupne RNK iz tkiva uretera

Obrada tkiva koja je prethodila ekstrakciji ukupne RNK je obuhvatala odsecanje jednakih fragmenata tkiva uretera (50-100mg) u sterilnim uslovima i homogenizaciju u sterilnim avanima. Dodavanje tečnog azota je olakšavalo homogenizaciju i ujedno inhibiralo aktivnost ribonukleaza. Ukupna RNK je ekstrahovana iz homogenata korišćenjem metode sa TRI Reagent-om po protokolu proizvođača (Ambion, Austin, SAD) za lizu $5-10 \times 10^6$ ćelija. Uzorci ekstrahovane RNK su čuvani na -70°C .

3.2.2. Merenje koncentracije i provera kvaliteta ekstrahovane RNK

Koncentracija i čistoća uzoraka ukupne tkivne RNK određene su spektrofotometrijski, na aparatu BioSpec-nano (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan). Izmerene koncentracije uzoraka RNK su izražene u $\text{ng}/\mu\text{l}$. Merenje apsorbcije RNK na 260nm, 230nm i 280nm korišćeno je za utvrđivanje čistoće uzoraka. Čistoća uzoraka RNK je bila u referentnom opsegu za odnos A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} koji iznosi 1,8-2,2. Kvalitet i integritet ukupne ćelijske RNK provereni su elektroforezom uzoraka na čipu, primenom RNA 6000 Nano Kit-a (Agilent, Palo Alto, SAD) na aparatu 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, SAD). Kvalitet testiranih uzoraka je bio u referentnom opsegu, pošto su na elektroforetogramima bile jasno uočljive frakcije ukupne ćelijske RNK, a vrednosti parametara RIN (engl. *RNA Integrity Number*), koji je pokazatelj integriteta RNK, iznosile prosečno 7-8 u ukupnom opsegu vrednosti od 0 do 10.

3.2.3. Reverzna transkripcija

Uzorci ekstrahovane RNK su obrađeni enzimom dezoksiribonukleaza I pre reakcije reverzne transkripcije (RT), kako bi se uklonili jednolančani i dvolančani molekuli DNK po protokolu proizvođača (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Reverzna transkripcija poli(A)+ frakcije RNK urađena je na jednakoj količini ukupne RNK od $1\mu\text{g}$ primenom oligo-dT₁₈ amplimera i RevertAid first strand cDNA synthesis kit-a (Fermentas, Vilnius, Litvanija) po protokolu proizvođača. Reverzna transkripcija malih RNK (miRNK i malih nukleolusnih RNK) urađena je na jednakoj količini

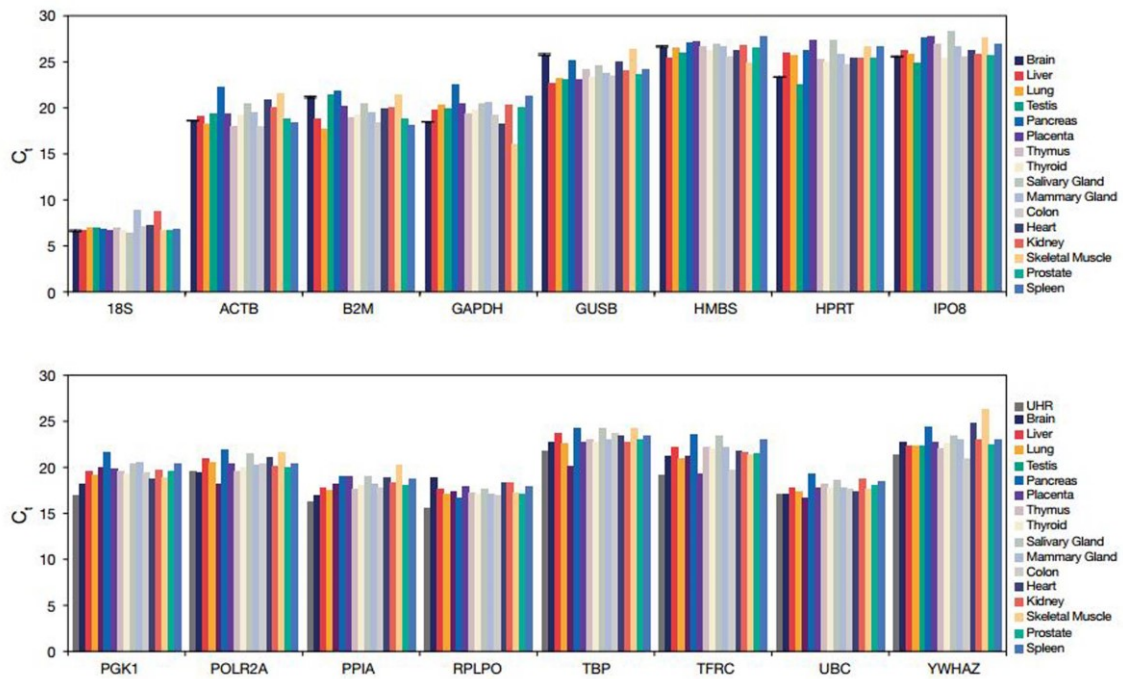
ukupne RNK od 10ng korišćenjem specifičnih amplimera sa strukturom ukosnice i TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit-a (Applied Biosystems, Foster City, SAD) po protokolu proizvođača.

3.2.4. Određivanje relativnog nivoa iRNK i mikro RNK metodom PCR u realnom vremenu

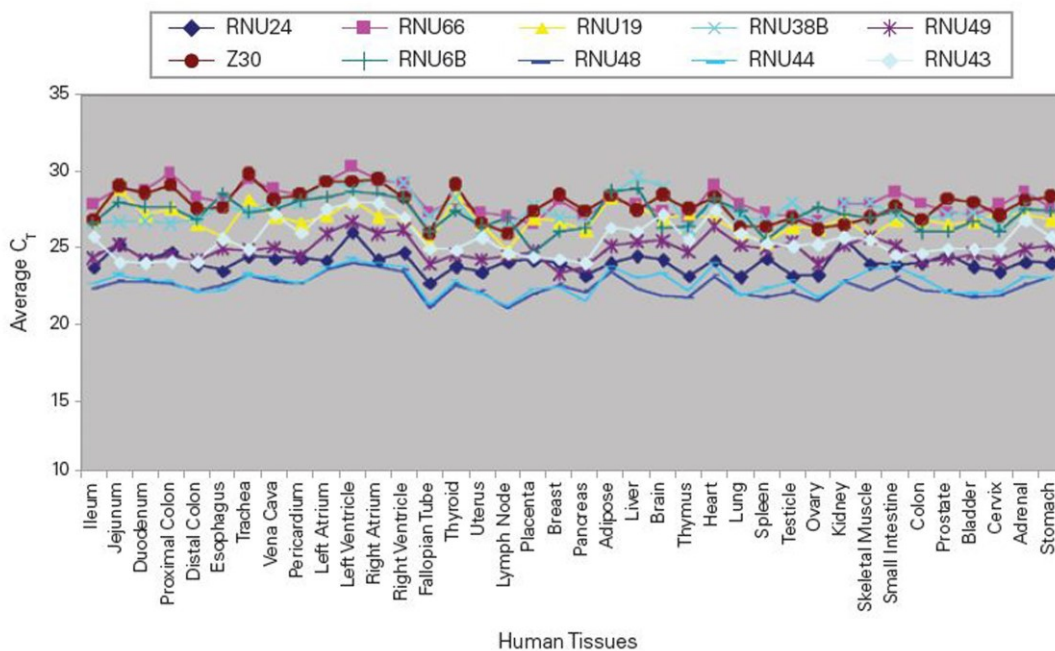
U ovom radu, za detekciju i relativnu kvantifikaciju transkripata gena i mikro RNK, korišćeni su odgovarajući TaqMan® komercijalni eseji po protokolu proizvođača (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Karakteristika svih korišćenih eseja za relativnu kvantifikaciju iRNK (cDNK) je da pokrivaju granicu između dva egzona, što ih čini visokospecifičnim za ciljni transkript ili varijante transkripata istog gena, koji su hibridizovali sa istom probom na GEČ-u: *RASD1* (Hs00607394_g1), *INA* (Hs00190771_m1), *LCN2* (Hs01008571_m1), *PROM1* (Hs01009257_m1), *SOSTDC1* (Hs00383602_m1) i *TAC3* (Hs00203109_m1). Korišćeni eseji za relativnu kvantifikaciju miRNK specifično su detektovali dominantnu formu zrele miRNK po miRBase bazi: miR-200a-3p (ID000502), miR-183-5p (ID002269), miR-375-3p (ID000564), miR-144-3p (ID002676). Kao stabilno eksprimirane (endogene) kontrole za normalizaciju nivoa ciljne iRNK (cDNK) i miRNK korišćeni su PPIA (Hs99999904_m1) (Slika M2) i mala nukleusna RNK RNU44 (ID 001094) (Slika M3) redom. Endogene kontrole su odabrane na osnovu evaluacije njihove ekspresije u tkivu urinarnog sistema od strane proizvođača

(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_042279.pdf i

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_044972.pdf) (Slika M2 i M3).



Slika M2. Ekspresija 16 potencijalnih endogenih kontrola na nivou iRNK u 16 različitih vrsta tkiva čovaka. Preuzeto od Applied Biosystems, Foster City, SAD.



Slika M3. Ekspresioni profil 10 malih nukleusnih/nukleolusnih RNK u 38 različitih vrsta tkiva čovaka. Preuzeto od Applied Biosystems, Foster City, SAD.

3.2.4.1. Kvantitativna analiza relativne ekspresije validiranih gena i miRNK

Za određivanje nivoa relativne ekspresije gena i miRNK qRT-PCR metodom u CAKUT-u u odnosu na kontrolu, primenjena je metoda komparacije Ct vrednosti (Schmittgen i Livak, 2008). Normalizovane i linearno transformisane vrednosti ekspresije gena i mikro RNK ($2^{-\Delta Ct}$) su upoređene između analiziranih grupa primenom Mann-Whitney U testa, a vrednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim.

3.2.5. Određivanje ekspresije gena celokupnog genoma na GEČ-u

Svi uzorci RNK uključeni u eksperiment određivanja ekspresije celokupnog genoma na GEČ-u ($n=26$, 19 pacijenata i 7 kontrola) su imali vrednost RIN-a > 7 . Prvi korak u pripremi RNK uzoraka za određivanje ekspresije celokupnog genoma je bila sinteza prvog lanca cDNK (reverznom transkripcijom) i sinteza drugog lanca cDNK. Nakon toga je, *in vitro* transkripcijom, izvršena sinteza komplementarne RNK (cRNK), koja u svojoj sekvenci sadrži ugrađeni biotin-UTP. Količina ukupne RNK za sintezu cRNK je bila jednaka za sve uzorke, i iznosila 200ng. Sinteza cDNK i cRNK je izvršena na frakciji poli(A)+ RNK jer je za sintezu prvog lanca cDNK korišćen T7-Oligo(dT) amplimer. Sinteza prvog i drugog lanca cDNK i *in vitro* transkripcija biotinom obeležene cRNK, kao i finalni tretman enzimom dezoksiribonukleazom I (DNKaza I) urađeni su TargetAmp™-Nano Labeling Kit-om za Illumina® Expression BeadChip® (Epicentre, Madison, SAD) po protokolu proizvođača. Rneasy MinElute Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka) je korišćen za prečišćavanje sintetisane cRNK.

Za hibridizaciju HumanHT-12 v4 ekspresionog čipa korišćeno je 750ng prečišćene cRNK. Hibridizacija, ispiranje čipa i obeležavanje hibridizovanih proba-cRNK dupleksa Cy3-Streptavidinom je urađeno po protokolu za Direct Hybridization Assay (Illumina, San Diego, SAD). Hibridizovani i obeleženi čipovi su skenirani iScan skenerom (Illumina, San Diego, SAD) pri čemu je izmeren intenzitet signala (nivo ekspresije) 47 000 različitih transkripata. Podaci o intenzitetu signala su iz iScan kontrolnog softvera eksportovani i dalje analizirani u softveru GenomeStudio 2011.1, Gene Expression v1.9 module (Illumina, San Diego, SAD).

3.2.6. Analiza ekspresije celokupnog genoma

3.2.6.1. Određivanje kvaliteta podataka o ekspresiji celokupnog genoma

Koncept kvaliteta podataka je u studiji definisan kao prikladnost podataka za određivanje diferencijalno eksprimiranih gena u CAKUT-u u odnosu na kontrolne uzorke. Problemi u kvalitetu podataka mogu poticati iz različitih izvora. Loša hibridizacija može dovesti do nejednake fluorescencije na čipu, dok razlike u kvalitetu RNK mogu rezultovati varijabilnom distribucijom intenziteta signala između uzoraka. Uklanjanje uzoraka koji su, na osnovu ispitivanih svojstava, van skupa uzoraka iste grupe, može značajno poboljšati odnos između signala i šuma, a samim tim povećati i efektivnost detekcije diferencijalno eksprimiranih gena. Kvalitet podataka je određen nakon inicijalne obrade podataka (\log_2 transformacija i kvantilna normalizacija). Kvalitet celokupnog seta podataka o genskoj ekspresiji je ispitan korišćenjem R/Bioconductor softvera i *arrayQualityMetrics* paketa (Kauffmann i sar., 2009).

3.2.6.2. Utvrđivanje diferencijalno eksprimiranih gena na nivou celokupnog genoma i bioinformatička analiza

Normalizacija srednjih vrednosti signala je realizovana \log_2 transformacijom i kvantilnom normalizacijom korišćenjem *lumi* R paketa (Du i sar., 2008). Nakon normalizacije, uklonjene su probe čija vrednost signala nije bila detektovana ili je bila veoma slaba. Uklapanje u linearni model u kombinaciji sa empirijskom Bajes statistikom je korišćeno za identifikaciju diferencijalno eksprimiranih gena, bazirano na moderiranom t-testu *limma* R paketa (Ritchie i sar., 2015). Diferencijalno eksprimirani geni odabrani za dalju analizu su selektovani na osnovu granične vrednosti $p < 0,01$ (nakon Benjamini & Hochberg korekcije) i apsolutne logaritamske promene ekspresije > 1 .

Nakon određivanja DEG izvršena je klaster analiza koja predstavlja multivarijacionu tehniku grupisanja objekata (gena i uzoraka) baziranu na karakteristikama koje poseduju. Klaster je grupa objekata koja pokazuje visoku sličnost u poređenju sa ostalim analiziranim objektima. U ovom radu korišćeno je

hijerarhijsko klasterovanje (D'Haeseleer, 2005) uz pomoć softvera Cluster 3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>) u cilju provere segregacije uzoraka u grupu pacijenata i grupu kontrola, a na osnovu korelacije u ekspresiji gena između uzoraka. Takođe, hijerarhijskim klasterovanjem moguća je i redukcija podataka formiranjem blokova ko-eksprimiranih gena. Logaritamski transformisane vrednosti (\log_2) intenziteta diferencijalno eksprimiranih gena korišćene su za hijerarhijsko klasterovanje uz prethodnu transformaciju srednjih vrednosti intenziteta svih gena $\text{AvgInt}_{(\log_2)}=0$, uz zadržavanje relativnih odnosa intenziteta između različitih uzoraka. Kao mera sličnosti između objekata na osnovu koje je konstruisan dendrogram pri hijerarhijskom klasterovanju korišćen je Pearson-ov koeficijent korelacije. Nakon formiranja matrice sličnosti između svih objekata koji ulaze u dendrogram, aglomerativni postupak je izvršen metodom prosečnog povezivanja gde se kao mera udaljenosti između dva klastera uzima prosek udaljenosti između svih članova ta dva klastera. Grafički prikaz klastera gena i uzoraka preko dendrograma kao i relativne ekspresije gena preko mape intenziteta boja (engl. *heatmap*-e) urađeni su Java TreeView V1.16r4 softverom (<http://jtreeview.sourceforge.net/>) (Saldanha, 2004) na osnovu rezultata klaster analize.

Primena tehnologije koja generiše veliku količinu podataka, u ovom slučaju, setova gena, zahteva i specifičnu, bioinformatičku obradu tih podataka. U ovoj studiji je izvršena *enrichment* analiza (ENA) tj. sistematično mapiranje velikog broja gena od interesa u biološke anotacione termine (npr. genska ontologija – GO), i ispitivanje statističke značajnosti rezultujućih asocijacija. Za sprovođenje ENA neophodan je referentni sistem (engl. *Background*) koji je u ovoj studiji bio lista transkripata sa HumanHT-12 v3 čipa. Rezultat ENA je veličina *fold enrichment* (FE) koja predstavlja meru asocijacije određenog anotacionog termina sa setom DEG, uzimajući u obzir veličinu anotacionog termina u referentnom sistemu. FE pokazuje koliko su puta geni koji pripadaju određenom anotacionom terminu više zastupljeni u setu DEG u odnosu na referentni sistem. ENA je na setu DEG urađena za GO termine koji pripadaju kategorijama biološki proces (BP) i molekularna funkcija (MF) onlajn alatom DAVID v6.7 (engl. *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), funkcijom *Functional Annotation Chart*

(^aHuang i sar., 2009; ^bHuang i sar., 2009). GO termini koji su u analizi imali FE >1,5 i p vrednost za modifikovani Fišerov egzakti test <0,05 su smatrani asociranim sa setom DEG i bili uključeni u biološku interpretaciju (^bHuang i sar., 2009).

U cilju analiziranja seta DEG uzimajući u obzir i interakcije među njima, u ovom radu je takođe izvršeno mapiranje molekularnih puteva i algoritamsko kreiranje molekularnih mreža komercijalnim softverom IPA (engl. *Ingenuity Pathway Analysis*) (QIAGEN, Hilden, Nemačka). Za razliku od DAVID algoritma, gde je bila potrebna samo lista diferencijalno eksprimiranih gena, IPA uzima u obzir i smer i veličinu promene ekspresije kao i statističku značajnost te promene. Algoritam ovog softvera, koji je trenutno među najuspešnijima u ovom tipu analize, određuje koji su najznačajniji molekularni putevi koji su pogođeni izmenjenom ekspresijom gena (i njihovih produkata). Kreiranje molekularnih mreža je korišćeno u cilju davanja dodatnih dimenzija podacima, ukazujući na interakcije gena iz različitih molekularnih puteva i povezujući set diferencijalno eksprimiranih gena u jedan dinamički sistem. IPA softver je takođe korišćen i za ENA bolesti i poremećaja u kojima su uključeni DEG iz ove studije. IPA softver koristi Fišerov egzakti test za statističku analizu funkcionalnih kategorija asociranih sa DEG, a vrednost $-\log(p) \geq 1,3$ je smatrana statistički značajnom.

3.2.7. Identifikacija miRNK potencijalno asociranih sa CAKUT-om na osnovu ekspresije celokupnog genoma i predikcije miRNK ciljnih gena

3.2.7.1. Validacija ko-inercione analize na javno dostupnim podacima o genskoj ekspresiji

Pretragom GEO baze (Barrett i sar., 2013) odabran je javno dostupan set GSE28829 podataka o genskoj ekspresiji celokupnog genoma u ranom (n=13) i uznapređovalom (n=16) aterosklerotskom plaku karotidne arterije (Doring i sar., 2012) za validaciju CIA metode (Madden i sar., 2010).

CIA, kao multivarijaciona tehnika za integraciju podataka, koristi kompletan set informacija o genskoj ekspresiji, pa inicijalno filtriranje podataka o transkriptomu nije neophodno. Ova robusna metoda identifikuje trendove u podacima i predstavlja ih grafičkim razdvajanjem, pa nije neophodno uklanjati

uzorke koji se po ekspresiji više razlikuju od ostalih u grupi. Prilikom validacije CIA korišćene su tabele miRNK vezujućih mesta kreirane od strane autora (Madden i sar., 2010), koje sadrže rezultate predviđanja miRNK vezujućih mesta dobijene na osnovu komplementarnosti sekvenci i evolucione konzervacije: TargetScan i TargetScanS (Lewis i sar., 2003) verzija 4.1 sa sajta <http://www.targetscan.org/>, PicTar4way i Pictar5way (Krek i sar., 2005) sa sajta <http://genome.ucsc.edu/>, i miRanda (Enright i sar., 2003) sa sajta <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>. Tabele su sadržale broj predviđenih vezujućih mesta svake miRNK na svakoj iRNK (Slika M4). CIA je korišćena za udruživanje 2 povezana seta podataka (podatke o nivoima iRNK i informacije o miRNK vezujućim mestima dobijene predikcijom) koji se odnose na iste objekte – gene (Slika M4).

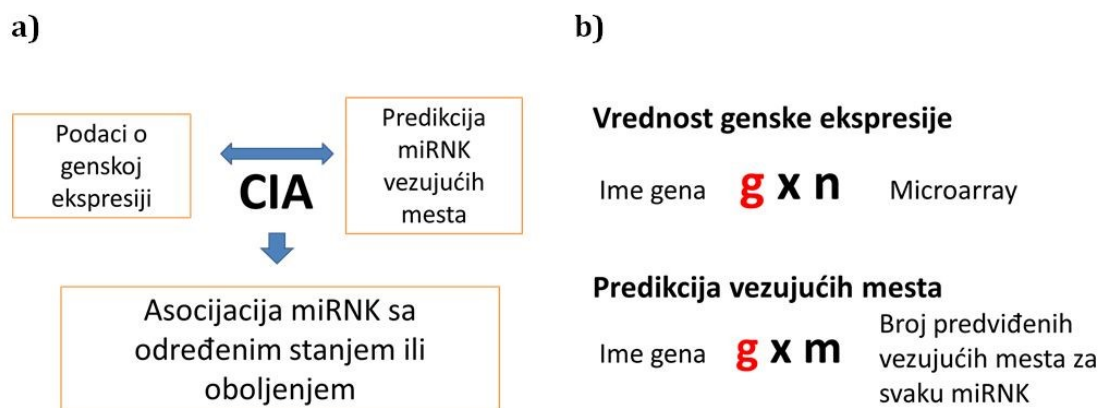
CIA je prvo primenjena bez nadzora, tj. bez prethodnog definisanja grupa pacijenata, sa NSC. Izvršene su dve NSC analize na dva povezana seta podataka u cilju redukcije informacija u dvodimenzionalni prostor. CIA nakon toga pronalazi parove maksimalno kovarirajućih osa između 2 seta podataka i predstavlja ih pomoću 2 povezana dijagrama. Na taj način je omogućena vizuelizacija odnosa između specifičnih ekspresionih profila u različitim uzorcima kao i potencijalnih miRNK čija bi aktivnost mogla rezultovati datim profilima. U cilju identifikacije miRNK koje su potencijalno asocirane sa različitim stadijumima karotidne ateroskleroze urađena je CIA sa BGA nadzorom. Ova klasifikaciona metoda pronalazi linearnu kombinaciju NSC osa koja maksimizira varijansu između unapred zadatih grupa, a minimizira varijansu unutar zadatih grupa.

CIA se sastojala od sledećih koraka:

1. Učitavanje i kvantilna normalizacija podataka o ekspresiji celokupnog genoma sa Affymetrix GEČ.
2. Povezivanje identifikacionih brojeva za probe na GEČ sa identifikacijama odgovarajućih transkripata iz baze referentnih sekvenci (RefSeq) korišćenjem anotacione biblioteke hgu133plus2cdf i kreiranje fajla parova afimetriks proba i odgovarajućih RefSeq anotacija.

3. Uklanjanje proba bez RefSeq informacije i izračunavanje srednje vrednosti intenziteta signala u slučajevima kada više proba vezuju transkripte istog gena.
4. Na pripremljenim podacima urađena je CIA analiza bez nadzora za svaki algoritam za predikciju miRNK vezujućih mesta, korišćenjem tabela koje su sadržale broj predviđenih vezujućih mesta svake miRNK na svakoj iRNK.
5. Definisanje grupa uzoraka i izvođenje CIA pod BGA nadzorom (CIA/BGA) i analiza rezultata za svaki algoritam za predikciju miRNK vezujućih mesta.

Rezultat analize su rang liste miRNK asociranih sa ranom i uznapredovalom karotidnom aterosklerozom, po jedna lista za svaki korišćeni predikcioni algoritam. Korišćenjem preporučenog pristupa za konzistenciju među rezultatima, po preporukama autora (Madden i sar., 2010), kao asocirane sa određenim stanjem okarakterisane su miRNK koje se u CIA rezultatima kod dva ili više predikciona algoritma rangiraju u prvih dvadeset. Kompletna analiza je urađena u *MADE4* R paketu (Culhane i sar., 2005).



Slika M4. a) CIA analiza vrši integraciju dve tabelarne vrste podataka (podaci o genskoj ekspresiji i predikcija miRNK vezujućih mesta) u cilju asocijacije miRNK sa stanjem ili oboljenjem. **b)** Prilikom analize, faktor koji povezuje dva seta podataka je ime gena.

Nakon CIA, urađena je sistematična pretraga naučne literature da bi uvideli koliko je miRNK asocirano sa ranim i uznapredovlim aterosklerotskim plakom. miRNK koje su bile opisane u literaturi su korišćene za evaluaciju CIA analize i njene primenljivosti u studiji. Takođe, miRNK koje nisu bile opisane u literaturi su bile klasifikovane kao potencijalna novina u izučavanju ateroskleroze.

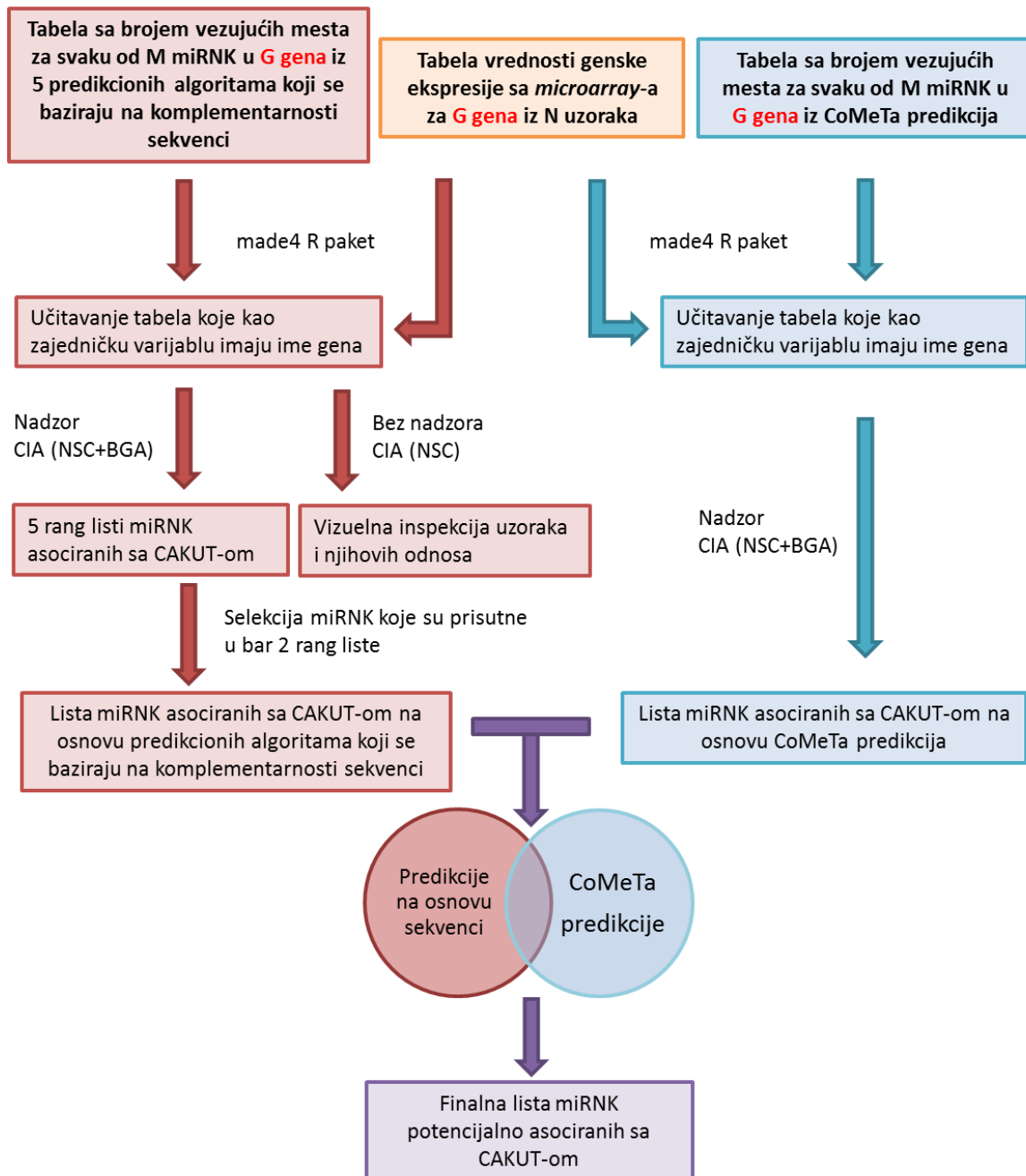
3.2.7.2. Integracija predikcija miRNK ciljnih gena iz CoMeTa u CIA i identifikacija miRNK potencijalno asociranih sa CAKUT-om

Kao prvi korak u određivanju miRNK asociranih sa CAKUT-om, urađena je CIA na podacima sa GEČ svih 26 uzoraka (19 pacijenata i 7 kontrola), bazirana na pet algoritama za predikciju miRNK ciljnih gena, zasnovanih na sekvenci, kao što je opisano u validaciji metode (Slika M5). Analiza je zahtevala kreiranje novog fajla parova koji ovoga puta sadrži informacije o sparivanju Illumina proba i odgovarajućih transkripata po RefSeq bazi. Nakon završene analize, dobijeno je 5 rang listi iz kojih su odabrane one miRNK koje po pravilu konzistencije među metodama imaju potencijalno povišenu ekspresiju u CAKUT-u u odnosu na kontrole (Madden i sar., 2010).

Za određivanje ključnih miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u CAKUT-u u odnosu na kontrole, odgovornih za specifični ekspresioni profil, bilo je neophodno dodatno filtriranje podataka tj. uvođenje predikcionog algoritma čija se predviđanja ne zasnivaju isključivo na komplementarnosti i evolucionoj konzerviranosti. Iz tog razloga, kreirana je dodatna tabela predikcija miRNK vezujućih mesta za svaku miRNK na osnovu podataka iz CoMeTa baze (<http://cometa.tigem.it>). Pošto rezultati CoMeTa predikcija ne sadrže informaciju o broju mesta (tj. odabrani su pozitivni ciljni geni koji spadaju u grupu do pedesetog percentila), kreirana tabela miRNK vezujućih mesta je kao broj vezujućih mesta po genu u svojim poljima mogla imati 1 ili 0. Budući da je u CoMeTa predviđanjima anotacija bila bazirana na genskim simbolima, a ne na RefSeq bazi, fajl parova je u ovom slučaju sparivao identifikaciju Illumina proba i simbol gena čiji transkript vezuje. Nakon izvršene CIA i kreiranja rang liste miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u CAKUT-u u odnosu na kontrole, prvih

15% rezultata je iskorišćeno za filtriranje rezultata dobijenih na predikcijama zasnovanim na sekvenci. Kao finalni rezultat zadržane su one miRNK koje su u obe CIA (CIA sprovedena na predviđanjima predikcionih algoritama zasnovanih na sekvenci i CIA sprovedena na predviđanjima CoMeTa analize) bile identifikovane kao miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na kontrolno tkivo (Slika M5).

Nakon određivanja miRNK potencijalno asociranih sa CAKUT-om, miRNK su sortirane u zajednice po miRCos metodi radi lakšeg odabira za validaciju qRT-PCR metodom (Gennarino i sar., 2012).



Slika M5. Primena CIA za identifikaciju ključnih miRNA u CAKUT-u. Dijagram objavljen na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.

3.2.7.3. Funkcionalna anotacija eksperimentalno validiranih miRNK u CAKUT-u

Analiza razvijena u cilju koekspresionog grupisanja miRNK ciljnih gena dobijenih predikcijom CoMeTa algoritma se zove *CO-Operational Level (COOL)* analiza (Gennarino i sar., 2012). Oformljene podgrupe ciljnih gena su korišćene za ENA na GO funkcionalnim terminima u cilju pronalaženja najznačajnijih procesa asociranih sa grupisanim genima. Analizom ovih, javno dostupnih podataka, selektovani su biološki procesi kontrolisani od strane validiranih miRNK. GO termini su odabrani na osnovu biološkog smisla i pravila da p vrednosti hipergeometrijskog testa sa Bonferroni korekcijom za značajne GO termine moraju biti $\leq 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Identifikacija ključnih gena, molekularnih puteva i mreža u patogenezi CAKUT-a kod čoveka

4.1.1. Kvalitet podataka o genskoj ekspresiji celokupnog genoma u CAKUT-u i kontrolnim uzorcima

Na osnovu dobijenih rezultata analize za određivanje kvaliteta podataka sa GEČ-a, odlučeno je da 4 uzorka uretera pacijenata sa CAKUT-om budu isključeni iz dalje analize zbog relativno velike distance između njih i ostalih ispitivanih uzoraka, izračunate na osnovu podataka o genskoj ekspresiji. Budući da su podaci svih ostalih uzoraka bili u referentnom opsegu u studiju određivanja diferencijalno eksprimiranih gena između ispitivanih grupa je uključeno 7 kontrolnih uzoraka i 15 uzoraka sa CAKUT-om.

4.1.2. Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u tkivu uretera dece sa CAKUT-om u poređenju sa zdravim kontrolama

Analiza podataka o ekspresiji celokupnog genoma, dobijenih sa GEČ-a, rezultovala je identifikacijom 87 statistički značajno diferencijalno eksprimiranih gena koje pokrivaju ekspresiju transkriptata 78 gena (Tabela R1 i R2). Među DEG, 51 gen je imao sniženu a 27 gena povišenu ekspresiju na nivou iRNK u CAKUT-u u odnosu na kontrole (Tabela R1 i R2).

Tabela R1. Diferencijalno eksprimirani geni sa sniženom ekspresijom u tkivu uretera kod pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na zdrave kontrole

Identifikacioni broj Illumina probe	Oficijalni genski simbol	Opis gena	RefSeq identifikacioni broj	Apsolutni log ₂ FC	P*
5310209	<i>TAC3</i>	tachykinin 3	NM_001006667.1	4,380	0,00008
3800048	<i>TAC3</i>	tachykinin 3	NM_013251.2	2,893	0,00008
2340066	<i>TCEAL6</i>	transcription elongation factor A (SII)-like 6	NM_001006938.1	2,869	0,00000
1230538	<i>INA</i>	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	NM_032727.2	2,709	0,00007
2710735	<i>RASD1</i>	RAS, dexamethasone-induced 1	NM_016084.3	2,294	0,00041
4040576	<i>IL6</i>	interleukin 6	NM_000600.1	2,142	0,00888
3520762	<i>DYNC111</i>	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	NM_004411.3	2,117	0,00001
6380669	<i>SPOCK1</i>	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	NM_004598.3	2,102	0,00008
1770364	<i>APOLD1</i>	apolipoprotein L domain containing 1	NM_030817.1	2,047	0,00038
6480468	<i>BEX1</i>	brain expressed, X-linked 1	NM_018476.3	1,950	0,00141
5050681	<i>TESC</i>	tescalcin	NM_017899.2	1,914	0,00660
2260477	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_000963.1	1,901	0,00053
5570102	<i>DKK1</i>	dickkopf homolog 1	NM_012242.2	1,734	0,00499
1820632	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_000963.1	1,732	0,00051
3180356	<i>NUDT10</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10	NM_153183.1	1,703	0,00205
6900086	<i>ADAMTS1</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	NM_006988.3	1,627	0,00299
6900692	<i>SCN11A</i>	sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha subunit	NM_014139.2	1,624	0,00324

Nastavak na sledećoj strani

7560041	<i>AXUD1</i>	AXIN1 up-regulated 1	NM_033027.2	1,606	0,00187
3310504	<i>PDK4</i>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	NM_002612.3	1,601	0,00324
6370356	<i>EEF1A2</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	NM_001958.2	1,555	0,00736
5690687	<i>CTGF</i>	connective tissue growth factor	NM_001901.1	1,544	0,00465
2640292	<i>CTGF</i>	connective tissue growth factor	NM_001901.2	1,531	0,00736
2850241	<i>CAPNS2</i>	calpain, small subunit 2	NM_032330.1	1,525	0,00246
4260201	<i>ACTC1</i>	actin, alpha, cardiac muscle 1	NM_005159.4	1,469	0,00465
1170300	<i>MT1G</i>	metallothionein 1G	NM_005950.1	1,452	0,00426
4280154	<i>SULT2A1</i>	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1	NM_003167.2	1,423	0,00205
3360750	<i>GPR98</i>	G protein-coupled receptor 98	NM_032119.3	1,405	0,00426
1240609	<i>TMEM16D</i>	Homo sapiens transmembrane protein 16D	NM_178826.2	1,382	0,00189
4890041	<i>DUSP8</i>	dual specificity phosphatase 8	NM_004420.2	1,364	0,00017
5420564	<i>NFIL3</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NM_005384.2	1,337	0,00096
1850097	<i>CA8</i>	carbonic anhydrase VIII	NM_004056.4	1,33	0,00007
2850551	<i>RCAN1</i>	regulator of calcineurin 1	NM_203417.1	1,314	0,00465
5490093	<i>LOC645548</i>	misc_RNA (LOC645548)	XR_017400.1	1,304	0,00405
6100494	<i>HS6ST2</i>	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	NM_147175.3	1,295	0,00324
6550600	<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467.3	1,294	0,00205
2030324	<i>SGK1</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	NM_005627.3	1,253	0,00041
6220440	<i>ANO4</i>	anoctamin 4	NM_178826.2	1,250	0,00465
6270646	<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467.3	1,224	0,00343
730196	<i>TCEAL6</i>	transcription elongation factor A (SII)-like 6	NM_001006938.2	1,222	0,00008
2230035	<i>KRT13</i>	keratin 13	NM_002274.3	1,181	0,00492
4850450	<i>DBC1</i>	deleted in bladder cancer 1	NM_014618.2	1,148	0,00255

Nastavak na sledećoj strani

1410209	<i>SGK1</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	NM_005627.3	1,130	0,00345
830491	<i>HS6ST2</i>	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	NM_001077188.1	1,119	0,00200
4390450	<i>SGK</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase	NM_005627.2	1,102	0,00205
1690692	<i>SOCS2</i>	suppressor of cytokine signaling 2	NM_003877.3	1,097	0,00008
1450240	<i>BEX5</i>	brain expressed, X-linked 5	NM_001012978.1	1,076	0,00558
2470524	<i>LYPD3</i>	LY6/PLAUR domain containing 3	NM_014400.2	1,074	0,00644
1400634	<i>MT1M</i>	metallothionein 1M	NM_176870.2	1,070	0,00644
7570647	<i>SNAP91</i>	synaptosomal-associated protein, 91kDa homolog (mouse)	NM_014841.1	1,069	0,00700
2680332	<i>CHP2</i>	calcineurin B homologous protein 2	NM_022097.2	1,058	0,00426
2120112	<i>TRIM9</i>	tripartite motif-containing 9	NM_015163.4	1,057	0,00700
1440477	<i>GAD1</i>	glutamate decarboxylase 1	NM_013445.3	1,055	0,00187
3400685	<i>OGDHL</i>	oxoglutarate dehydrogenase-like	NM_018245.1	1,032	0,00113
1170246	<i>GEM</i>	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	NM_181702.1	1,026	0,00410
5900368	<i>MSMB</i>	microseminoprotein beta	NM_002443.2	1,025	0,00524
2690035	<i>C9ORF24</i>	chromosome 9 open reading frame 24	NM_147168.1	1,011	0,00096
3290630	<i>SERPINA5</i>	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5	NM_000624.3	1,010	0,00835
6620528	<i>MT1X</i>	metallothionein 1X	NM_005952.2	1,005	0,00539

* moderirani t-test sa Benjamini i Hochberg korekcijom

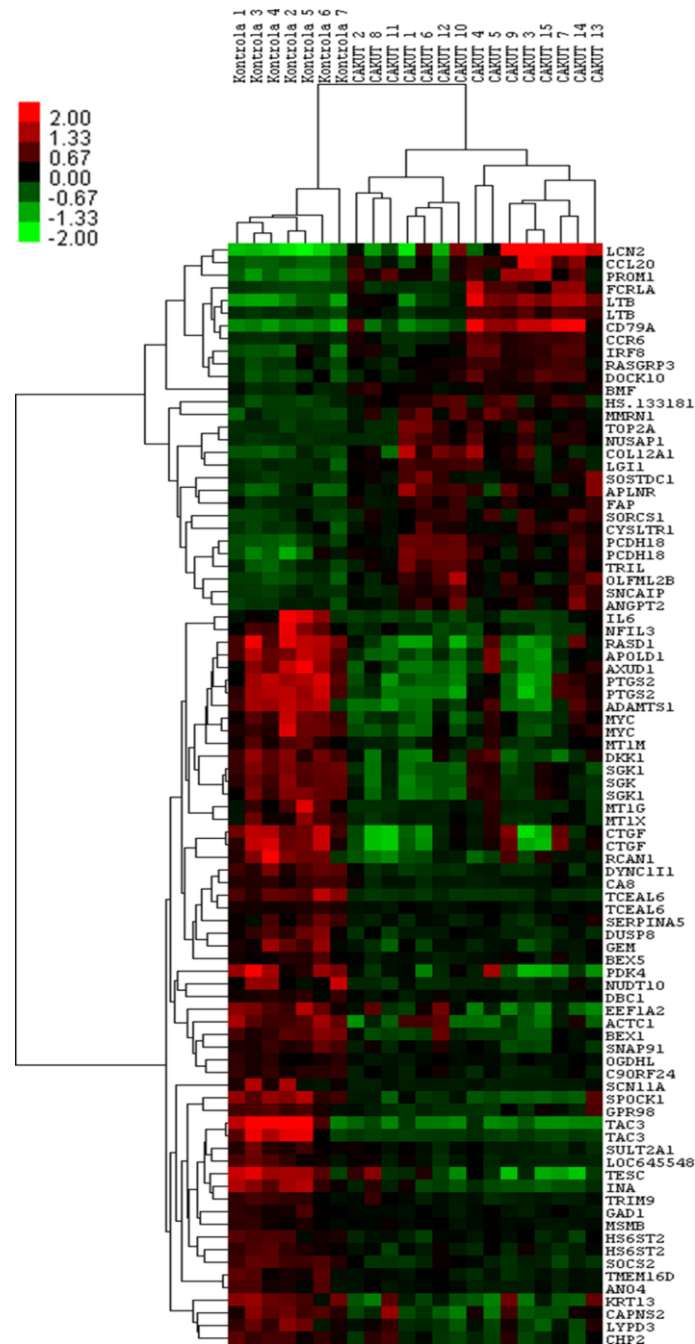
Tabela R2. Diferencijalno eksprimirani geni sa povišenom ekspresijom u tkivu uretera kod pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na zdrave kontrole

Identifikacioni broj Illumina probe	Oficijalni genski simbol	Opis gena	RefSeq identifikacioni broj	Apsolutni log ₂ FC	P*
4390398	<i>LCN2</i>	lipocalin 2	NM_005564.3	3,680	0,00648
3940504	<i>CD79A</i>	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	NM_021601.3	2,548	0,00603
5310053	<i>LTB</i>	lymphotoxin beta	NM_002341.1	2,227	0,00135
3780193	<i>FCRLA</i>	Fc receptor-like A	NM_032738.3	2,079	0,00600
4220246	<i>CCL20</i>	chemokine (C-C motif) ligand 20	NM_004591.1	1,978	0,00700
7400452	<i>PROM1</i>	prominin 1	NM_006017.1	1,697	0,00034
2710020	<i>HS.133181</i>	BX093329 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA	Hs.133181	1,542	0,00205
5420091	<i>LTB</i>	lymphotoxin beta	NM_002341.1	1,520	0,00465
4070438	<i>APLNR</i>	apelin receptor	NM_005161.3	1,517	0,00426
3990619	<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha	NM_001067.2	1,476	0,00324
7150019	<i>OLFML2B</i>	olfactomedin-like 2B	NM_015441.1	1,384	0,00278
6480753	<i>PCDH18</i>	protocadherin 18	NM_019035.2	1,323	0,00027
3060095	<i>COL12A1</i>	collagen, type XII, alpha 1	NM_080645.2	1,288	0,00465
4810273	<i>SOSTDC1</i>	sclerostin domain containing 1	NM_015464.2	1,264	0,00465
2100706	<i>SORCS1</i>	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1	NM_001013031.1	1,258	0,00205
5890470	<i>CCR6</i>	chemokine (C-C motif) receptor 6	NM_031409.3	1,256	0,00834
5960762	<i>PCDH18</i>	protocadherin 18	NM_019035.2	1,182	0,00324
1500553	<i>NUSAP1</i>	nucleolar and spindle associated protein 1	NM_018454.5	1,178	0,00420
5690239	<i>TRIL</i>	TLR4 interactor with leucine rich repeats	NM_014817.3	1,176	0,00278
5090626	<i>FAP</i>	fibroblast activation protein, alpha	NM_004460.2	1,136	0,00187
150072	<i>IRF8</i>	interferon regulatory factor 8	NM_002163.2	1,070	0,00379
2070402	<i>CYSLTR1</i>	cysteinyl leukotriene receptor 1	NM_006639.2	1,069	0,00205

Nastavak na sledećoj strani

4150068	<i>LG11</i>	leucine-rich, glioma inactivated 1	NM_005097.1	1,066	0,00465
1050008	<i>MMRN1</i>	multimerin 1	NM_007351.2	1,064	0,00173
2450400	<i>RASGRP3</i>	RAS guanyl releasing protein 3	NM_170672.1	1,055	0,00147
1660019	<i>SNCAIP</i>	synuclein, alpha interacting protein	NM_005460.2	1,035	0,00204
1710736	<i>DOCK10</i>	dedicator of cytokinesis 10	NM_014689.2	1,029	0,00251
110280	<i>BMF</i>	Bcl2 modifying factor	NM_033503.3	1,023	0,00144
3450066	<i>ANGPT2</i>	angiopoietin 2	NM_001147.1	1,018	0,00800

* moderirani t-test sa Benjamini i Hochberg korekcijom



Slika R1. Hijerarhijsko klasterovanje diferencijalno eksprimiranih gena. Obojeni ključ (gore levo) predstavlja normalizovani relativni odnos ekspresije kroz intenzitet boja.

Hijerarhijskim klasterovanjem DEG pokazano je da postoji jasna segregacija između pacijenata sa CAKUT-om i kontrola, čime je i potvrđeno da je identifikovanih 78 gena ključno za razdvajanje ova dva fenotipa (Slika R1).

4.1.3. Identifikacija bioloških procesa, molekularnih funkcija i kanonskih molekularnih puteva asociranih sa DEG i algoritamsko kreiranje mreža interakcija DEG (GO ENA i IPA)

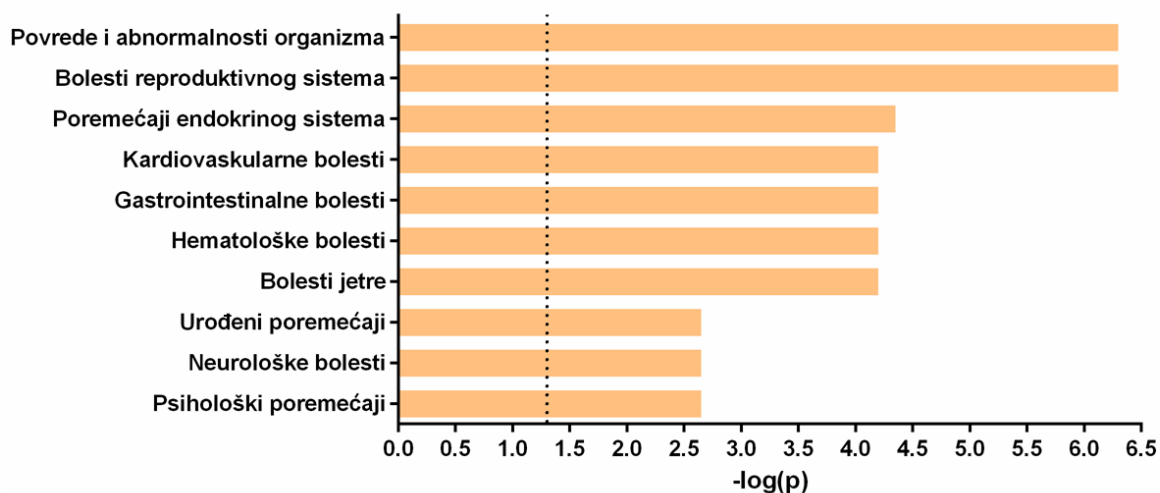
Primenom GO ENA na listi DEG identifikovano je 17 bioloških procesa i 2 molekularne funkcije koji su statistički značajno asocirani sa DEG (Tabela R3).

Tabela R3. Rezultati GO ENA na setu DEG

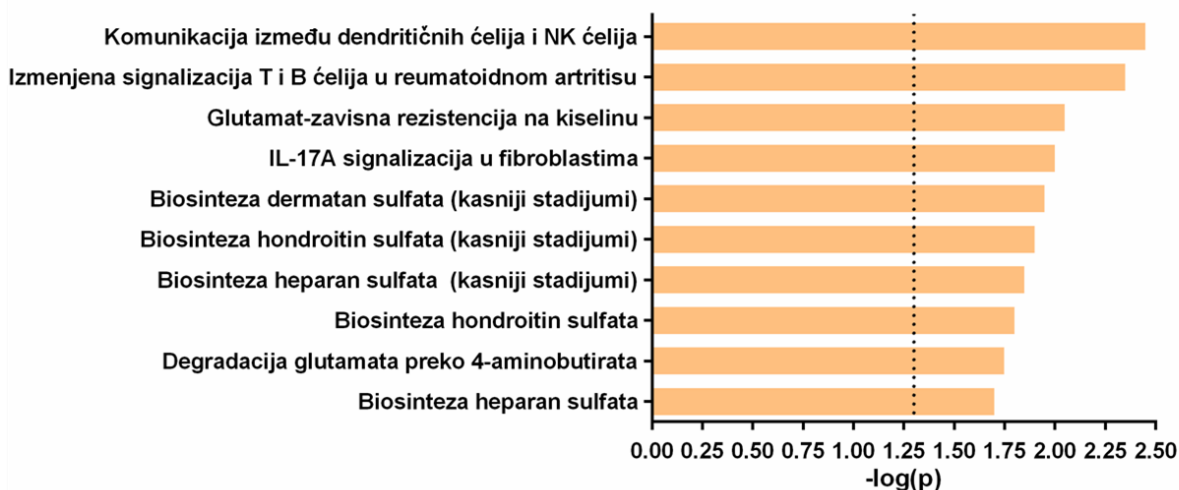
GOBPID	Termin	Broj	FE	p*
GO:0009612	Odgovor na mehanički stimulus	4	15,9	0,00190
GO:0050806	Pozitivna regulacija sinaptičke transmisije	3	19,6	0,00980
GO:0051971	Pozitivna regulacija transmisije nervnog impulsa	3	18,0	0,01200
GO:0031646	Pozitivna regulacija neuroloških procesa	3	17,1	0,01300
GO:0007166	Signalna transdukcija povezana sa receptorima na površini ćelije	15	1,9	0,02000
GO:0050804	Regulacija sinaptičke transmisije	4	6,7	0,02100
GO:0006955	Imuni odgovor	8	2,8	0,02200
GO:0051969	Regulacija transmisije nervnog impulsa	4	6,2	0,02600
GO:0031644	Regulacija neuroloških procesa	4	5,9	0,02900
GO:0006935	Hemotaksa	4	5,6	0,03300
GO:0042330	Kretanje	4	5,6	0,03300
GO:0008219	Ćelijska smrt	8	2,5	0,03600
GO:0016265	Smrt	8	2,5	0,03700
GO:0050910	Detekcija mehaničkog stimulusa uključenog u percepciji zvuka	2	49,4	0,03900
GO:0008544	Razviće epidermisa	4	5,0	0,04500
GO:0006915	Apoptoza	7	2,6	0,04600
GO:0012501	Programirana ćelijska smrt	7	2,6	0,04900
GOMFID	Termin	Broj	FE	p*
GO:0046870	Vezivanje kadmijumovog jona	3	70,0	0,00076
GO:0005507	Vezivanje jona bakra	3	10,8	0,03000

GOBPID – Identifikacioni broj biološkog procesa u bazi GO; GOMFID – Identifikacioni broj molekularne funkcije u bazi GO; Broj – Broj DEG uključenih u određeni termin; *- modifikovani Fišerov egzaktni test; FE –*Fold Enrichment*

Nakon GO ENA, analiza IPA softverom je korišćena za identifikaciju bolesti i poremećaja kao i kanonskih molekularnih puteva statistički značajno asociranih sa DEG (Slika R2 i R3).



Slika R2. Analiza IPA softverom. Bolesti i poremećaji asocirani sa DEG. Isprekidana linija predstavlja $-\log(p)=1,3$ što je ekvivalent $p=0,05$, Fišerov egzakti test.



Slika R3. Analiza IPA softverom. Najznačajniji molekularni putevi asocirani sa DEG. Molekularni putevi su bili članovi inflamatornog procesa, imunskog odgovora i biosinteteze glikozaminoglikana. Isprekidana linija predstavlja $-\log(p)=1,3$ što je ekvivalent $p=0,05$, Fišerov egzakti test.

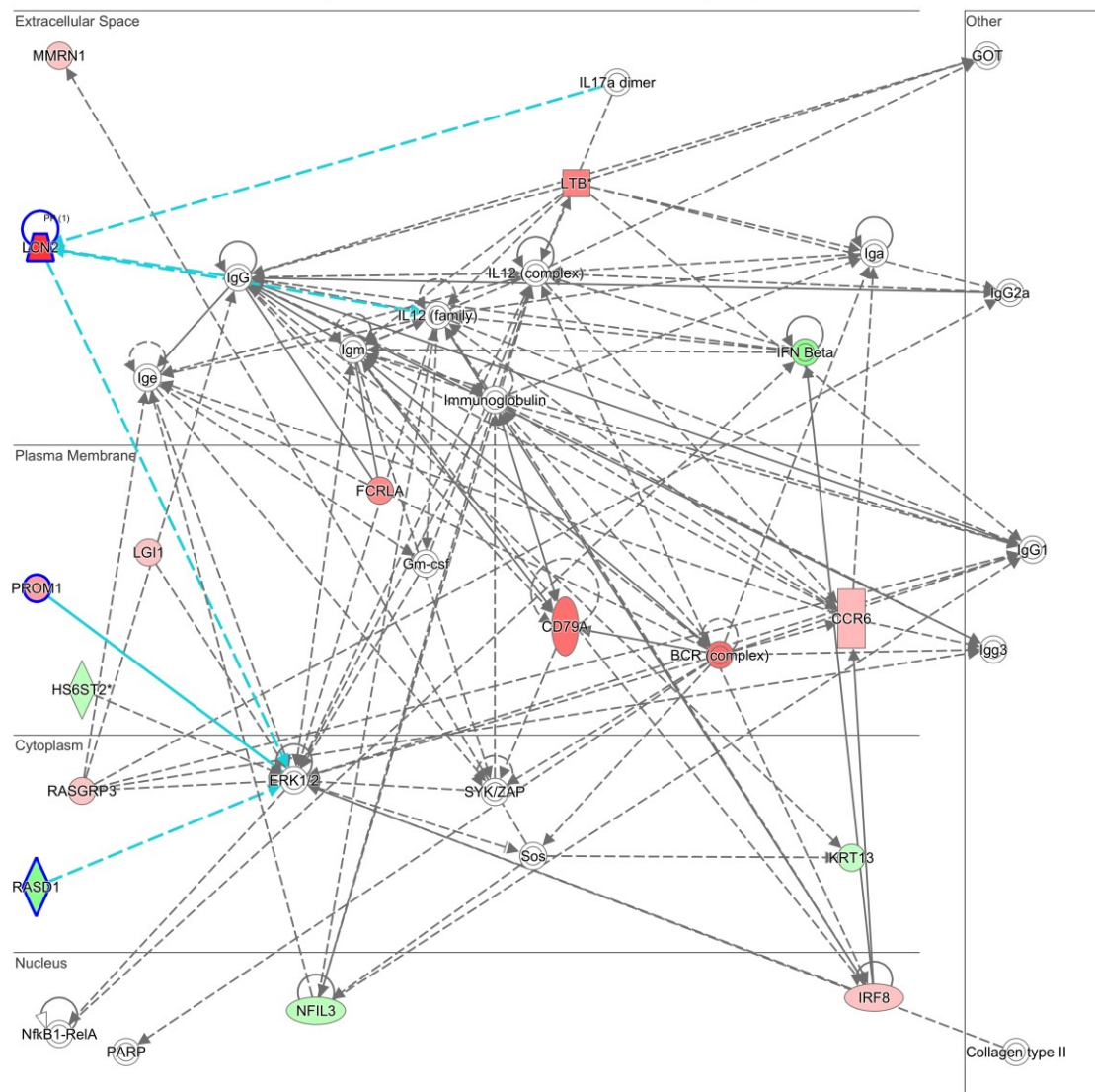
Analizom interakcija DEG IPA softverom dobijeno je sedam molekularnih mreža (Tabela R4), od kojih četiri (mreža 1, 3, 5 i 7) (Tabela R4) sadrže gene sa funkcijama koje se direktno mogu asociirati sa CAKUT-om (Slika R4, R5, R6 i R7).

Tabela R4. Najznačajnije molekularne mreže dobijene analizom interakcija diferencijalno eksprimiranih gena u CAKUT-u

Br	Oboljenje ili funkcija	Rezultat	Broj fokus molekula
1	Ćelijska morfologija, humoralni imuni odgovor, razviće i struktura limfoidnog tkiva	27	14
2	Genska ekspresija, metabolizam aminokiselina, kancer	27	14
3	Kancer, povrede i abnormalnosti organizma, oboljenja reproduktivnog sistema	23	12
4	Kardiovaskularna oboljenja, signalizacija i interakcija između ćelija, poremećaji vezivnih tkiva	18	10
5	Ćelijska morfologija, funkcija i održanje ćelije, embrionalno razviće	18	10
6	Metabolizam nukleinskih kiselina, kancer, hematološka oboljenja	14	8
7	Razvojni poremećaj, poremećaji endokrinog sistema, urođeni poremećaj	9	6

Rezultat= $-\log(p \text{ vrednost Fišerov egzaktni test})$; Broj fokus molekula – Broj DEG uključenih u mrežu

Network 1 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All : IPA.15.03.2016 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

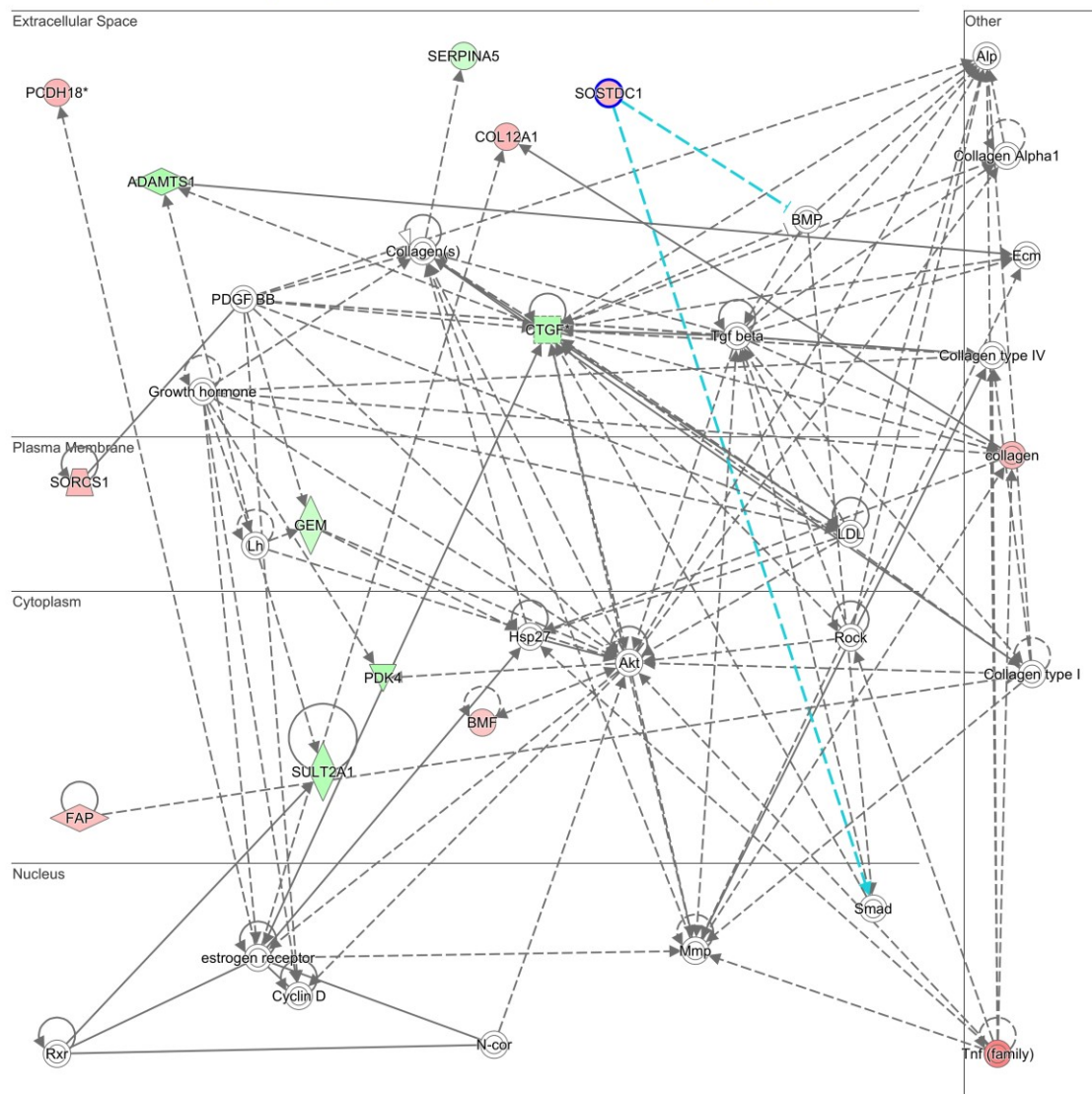
Slika R4. Analiza IPA softverom. Mreža 1: Ćelijska morfologija, humoralni imuni odgovor, razviće i struktura limfoidnog tkiva. Dijagram je rezultat analize seta DEG i pokazuje interakcije 14 diferencijalno eksprimiranih gena. Crvenom bojom su obeleženi geni sa povišenom ekspresijom dok su zelenom bojom obeleženi geni sa sniženom ekspresijom u CAKUT-u.

Različiti oblici imaju različito značenje, kao što je opisano na:

http://ingenuity.force.com/ipa/articles/Feature_Description/Legend.

Tri obeležena gena: *LCN2*, *PROM1* i *RASD1* su korišćeni za validaciju mreže qRT-PCR metodom.

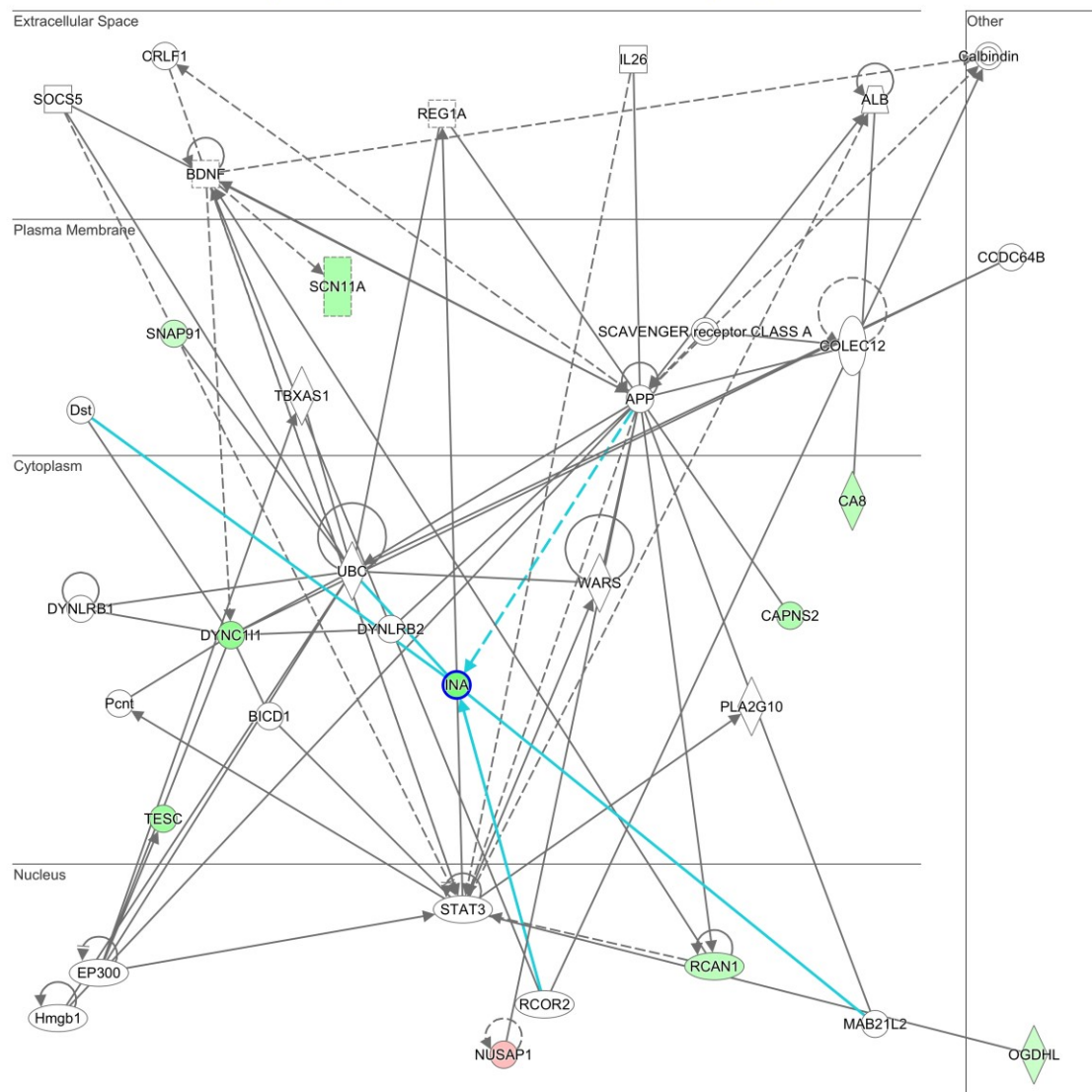
Network 3 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All : IPA.15.03.2016 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Slika R5. Analiza IPA softverom. Mreža 3: Kancer, povrede i abnormalnosti organizma, oboljenja reproduktivnog sistema. Dijagram je rezultat analize seta DEG korišćenjem IPA softvera i pokazuje interakcije 12 diferencijalno eksprimiranih gena. Crvenom bojom su obeleženi geni sa povišenom ekspresijom dok su zelenom bojom obeleženi geni sa sniženom ekspresijom u CAKUT-u. Različiti oblici imaju različito značenje, kao što je opisano na: http://ingenuity.force.com/ipa/articles/Feature_Description/Legend. Obeleženi gen *SOSTDC1* je korišćen za validaciju mreže qRT-PCR metodom.

Network 5 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All : IPA.15.03.2016 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

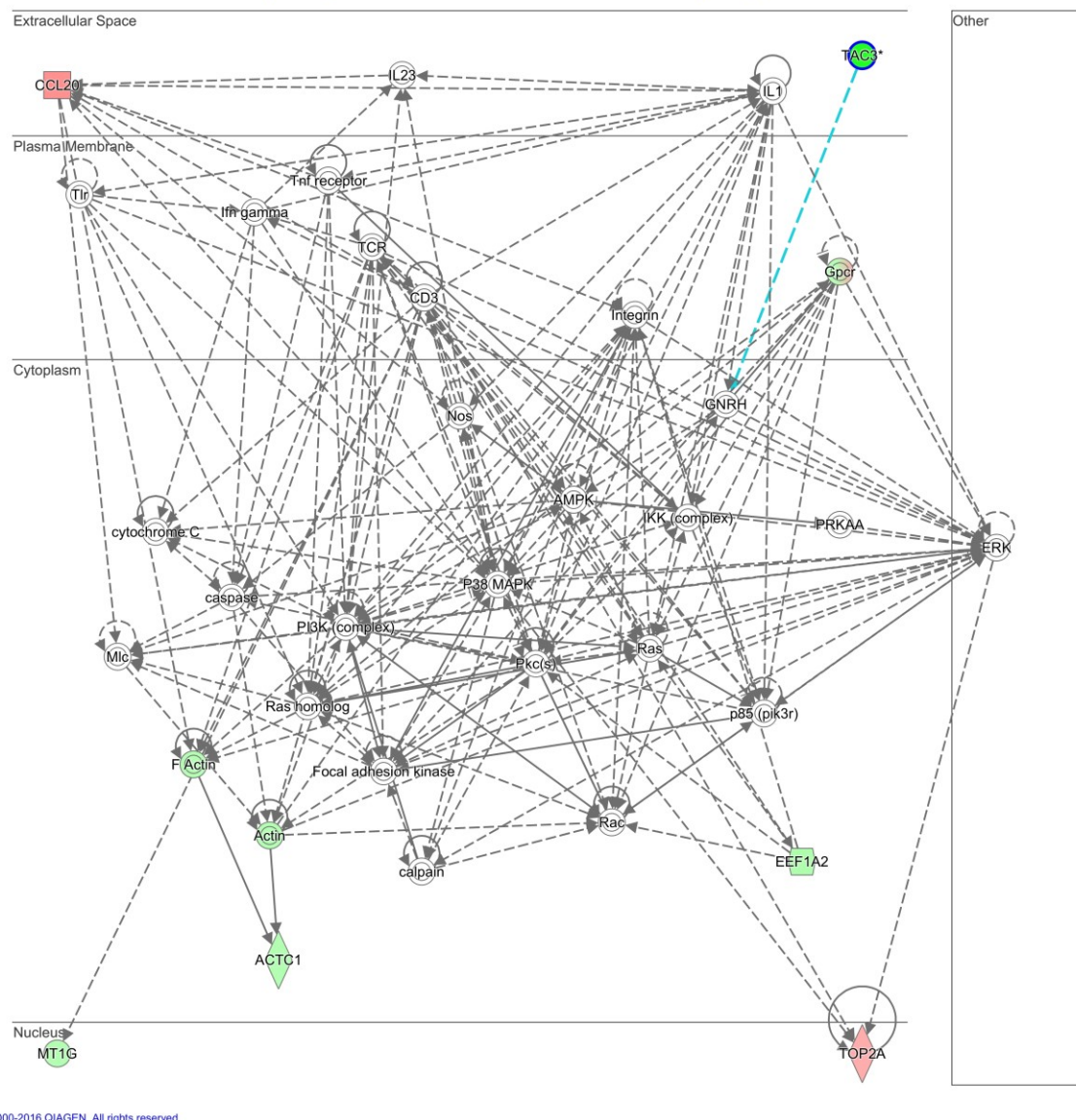
Slika R6. Analiza IPA softverom. Mreža 5: Ćelijska morfologija, funkcija i održanje ćelije, embrionalno razviće. Dijagram je rezultat analize seta DEG korišćenjem IPA softvera i pokazuje interakcije 10 diferencijalno eksprimiranih gena. Crvenom bojom su obeleženi geni sa povišenom ekspresijom dok su zelenom bojom obeleženi geni sa sniženom ekspresijom u CAKUT-u.

Različiti oblici imaju različito značenje, kao što je opisano na:

http://ingenuity.force.com/ipa/articles/Feature_Description/Legend.

Obeleženi gen *INA* je korišćen za validaciju mreže qRT-PCR metodom.

Network 7 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All : IPA.15.03.2016 : IPA.15.03.201602:33PM.Conf.Exp.Pred.Spec.All



Slika R7. Analiza IPA softverom. Mreža 7: Razvojni poremećaj, poremećaji endokrinog sistema, urođeni poremećaj. Dijagram je rezultat analize seta DEG korišćenjem IPA softvera i pokazuje interakcije 6 diferencijalno eksprimiranih gena. Crvenom bojom su obeleženi geni sa povišenom ekspresijom dok su zelenom bojom obeleženi geni sa sniženom ekspresijom u CAKUT-u. Različiti oblici imaju različito značenje, kao što je opisano na: http://ingenuity.force.com/ipa/articles/Feature_Description/Legend. Obeleženi gen *TAC3* je korišćen za validaciju mreže qRT-PCR metodom.

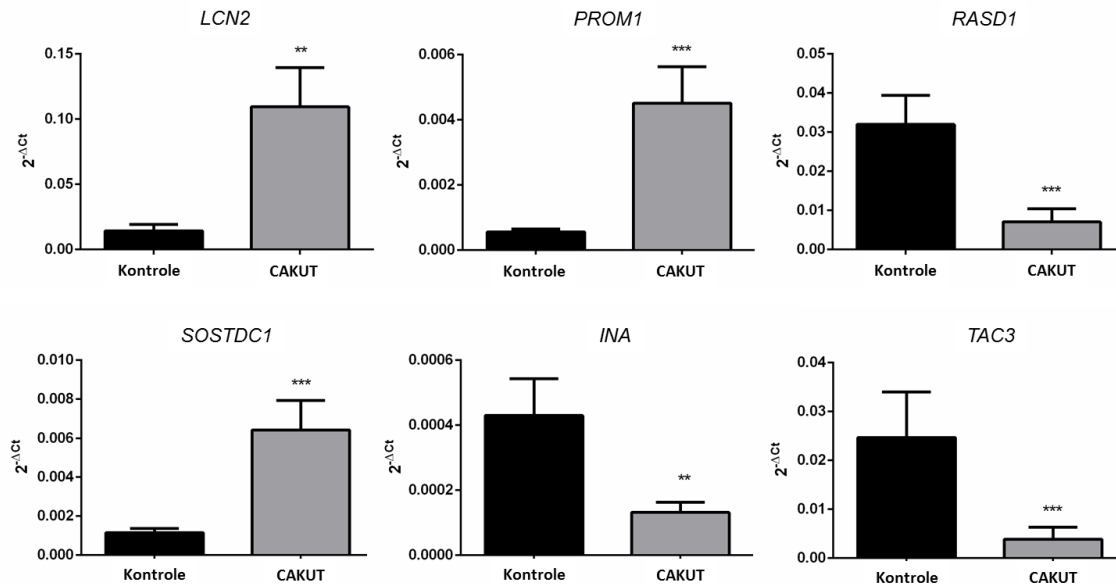
4.1.4. Validacija najznačajnijih molekularnih mreža qRT-PCR metodom

Analizom relativnih nivoa iRNK odabranih gena validirane su ključne molekularne mreže u ovoj studiji (Tabela R5, Slika R8).

Tabela R5. Relativna ekspresija validiranih gena u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na kontrole.

Gen	Smer promene ekspresije u CAKUT-u	FC qRT-PCR	p ^a -qRT-PCR	Apsolutni log ₂ FC GEČ	p ^b - GEČ
<i>LCN2</i>	Povišena	7,63	0,0027	3,68	0,00648
<i>PROM1</i>	Povišena	8,02	0,0004	1,70	0,00034
<i>RASD1</i>	Snižena	4,52	< 0,0001	2,29	0,00041
<i>SOSTDC1</i>	Povišena	5,56	0,0004	1,26	0,00465
<i>INA</i>	Snižena	3,27	0,0016	2,71	0,00007
<i>TAC3</i>	Snižena	6,63	0,0004	4,38	0,00008

^a Man Whitney U test; ^b moderirani t-test sa Benjamini i Hochberg korekcijom; FC – *Fold Change* pokazuje koliko je puta nivo iRNK ispitivanog gena viši/nži u ciljnoj grupi u odnosu na referentnu grupu uzoraka.



Slika R8. Prikaz rezultata kvantifikacije ekspresije ispitanih gena. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti 2^{-ΔCt} sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Razlika od kontrole Mann-Whitney U test, *** p<0,001, **p<0,01.

4.2. Validacija CIA metode u definisanju miRNK asociranih sa karakterističnim razlikama u ekspresiji genoma između dva različita fenotipa, na postojećim podacima

Za svaku od pet CIA analiza sa BGA nadzorom, urađenih sa pet različitih predikcionih algoritama zasnovanih na sekvenci, dobijene su miRNK asocirane sa karakterističnom ekspresijom genoma kod dva različita fenotipa (dve različite faze ateroskleroze). Odabir specifičnih miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u određenom fenotipu urađen je primenom pravila konzistencije: miRNK koje se rangiraju u prvih dvadeset miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u bar dve CIA analize (Tabela R6 i R7).

Tabela R6. miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u ranom aterosklerotskom plaku u odnosu na uznapredovali aterosklerotski plak na osnovu CIA/BGA analize izvršene sa pet različitih algoritama za predikciju miRNK vezujućih mesta zasnovanih na sekvenci

Pictar4way	Pictar5way	miRanda	TargetScan	TargetScanS
miR-155	miR-130a	miR-24	miR-22	miR-148
miR-198	miR-130b	miR-563	let-7/98	miR-152
miR-124a	miR-129	miR-432	miR-223	let-7
miR-34c	miR-7	miR-138	miR-34b	miR-98
miR-215	miR-24	miR-206	miR-410	miR-26
miR-185	miR-143	miR-637	miR-193	miR-27
miR-140	miR-193a	miR-128a	miR-155	miR-101
miR-145	miR-34c	miR-128b	miR-24	miR-144
miR-328	miR-203	miR-526b	miR-185	miR-193
miR-188	miR-369-3p	miR-30a-3p	miR-455	miR-369
miR-24	miR-155	miR-518f	miR-383	miR-205
miR-324-5p	miR-140	miR-373	miR-145	miR-29
miR-339	miR-34b	miR-622	miR-340	miR-22
miR-325	miR-100	miR-620	miR-339	miR-145
miR-208	miR-99a	miR-608	miR-411	miR-135
miR-99a	miR-30a-3p	miR-588	miR-328	miR-155
miR-191	miR-145	miR-412	miR-423	miR-24
miR-100	miR-30e-3p	miR-612	miR-188	miR-187
miR-99b	miR-216	miR-585	miR-100	miR-100
miR-187	miR-299-3p	miR-525	miR-99	miR-99

miRNK koje se pojavljuju u 2 ili više predikciona algoritma su označene masnim slovima. Tabela objavljena u Jovanović i sar., 2014.

Tabela R7. miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u uznapredovalom aterosklerotskom plaku u odnosu na rani aterosklerotski plak na osnovu CIA/BGA analize izvršene sa pet različitih algoritama za predikciju miRNK vezujućih mesta zasnovanih na sekvenci

Pictar4way	Pictar5way	miRanda	TargetScan	TargetScanS
miR-213	miR-302a*	miR-429	miR-487b	miR-146
miR-371	miR-146a	miR-200b	miR-151	miR-122
miR-146b	miR-146b	miR-144	miR-187	miR-216
miR-302a*	miR-126	miR-641	miR-127	miR-139
miR-368	miR-190	miR-643	miR-122	miR-217
miR-324-3p	miR-199a	miR-346	miR-384	miR-141
miR-31	miR-223	miR-581	miR-451	miR-194
miR-182*	miR-22	miR-193a	miR-136	miR-192
miR-190	miR-199b	miR-502	miR-500	miR-215
miR-127	miR-142-5p	miR-222	miR-382	miR-1
miR-217	miR-299-5p	miR-221	miR-486	miR-206
miR-221	miR-181b	miR-562	miR-325	miR-18
miR-323	miR-125b	miR-200a	miR-146	miR-190
miR-222	miR-181a	miR-485-3p	miR-190	miR-21
miR-372	miR-181c	miR-487a	miR-361	miR-302
miR-134	miR-214	miR-29a	miR-433-3p	miR-372
miR-302b*	miR-20b	miR-154	miR-378	miR-373
miR-320	miR-217	miR-105	miR-299-3p	miR-93
miR-184	miR-17-5p	miR-508	miR-134	miR-221
miR-21	miR-106b	miR-342	miR-494	miR-222

miRNK koje se pojavljuju u 2 ili više predikciona algoritma su označene masnim slovima. Tabela objavljena u Jovanović i sar., 2014.

Identifikovano je 17 miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u ranom plaku u odnosu na uznapredovali plak (Tabela R8). U uznapredovalom aterosklerotskim plaku je identifikovano 12 miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u odnosu na rani plak na osnovu CIA (Tabela R8). Pretragom literature je pokazano da je 5 miRNK asociranih sa uznapredovalom aterosklerozom već opisano u procesima odgovornim za progresiju ateroskleroze (Tabela R9). Sa druge strane, 3 miRNK koje je CIA prepoznala kao karakteristične za rani plak su u literaturi bile opisane u procesima protektivnim u kontekstu progresije plaka (Tabela R9).

Tabela R8. miRNK asocirane sa karakterističnom ekspresijom genoma u ranom i uznapredovalom aterosklerotskom plaku nakon primene metode konzistencije između CIA analiza

miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u ranom aterosklerotskom plaku	miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u uznapredovalom aterosklerotskom plaku
miR-100	miR-122
miR-140	miR-127
miR-145	miR-134
miR-155	miR-146
miR-185	miR-146b
miR-187	miR-190
miR-188	miR-217
miR-193	miR-221
miR-22	miR-222
miR-24	miR-21
miR-30a-3p	miR-302a*
miR-328	miR-372
miR-339	
miR-34b	
miR-34c	
miR-99	
miR-99a	

Tabela R9. miRNK opisane u literaturi kao faktor rizika ili protektivne u kontekstu progresije ateroskleroze

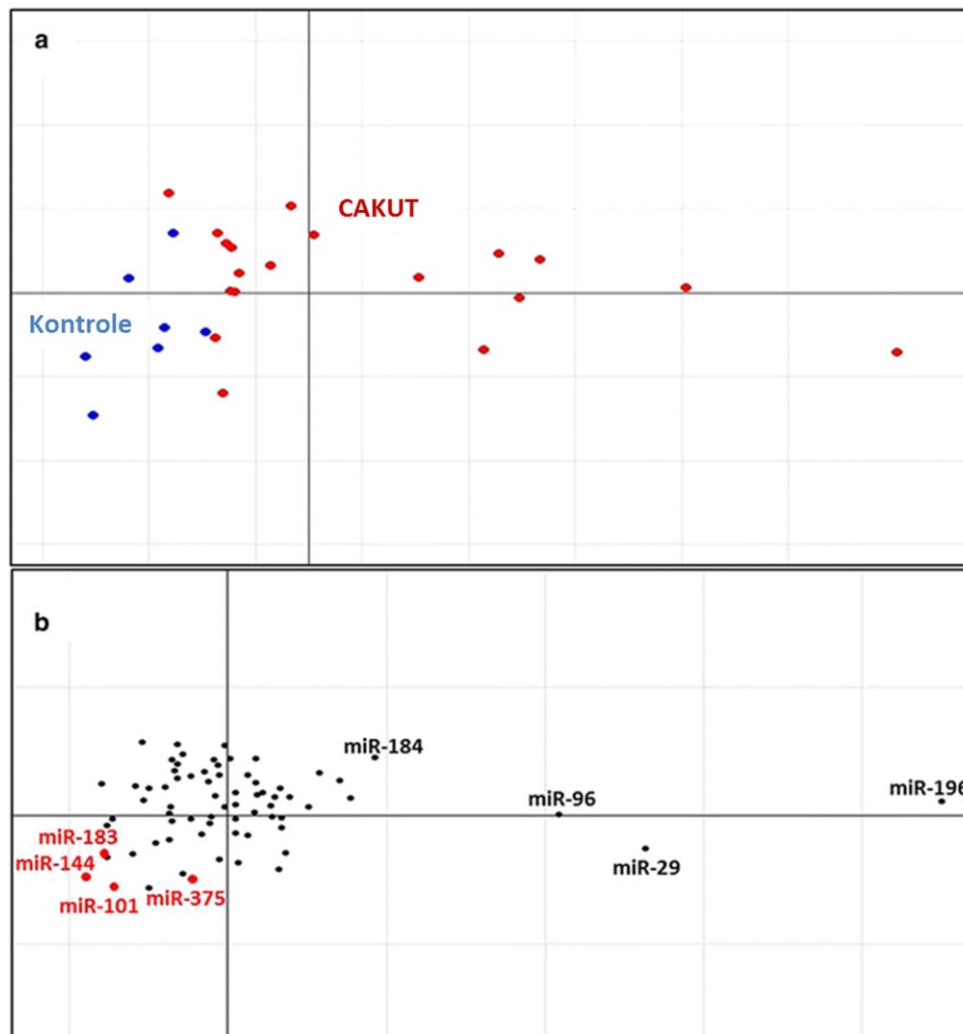
Faktor rizika	miR-221	miR-222	miR-21	miR-127	miR-146
Protektivne	miR-100	miR-145	miR-155		

4.3. Identifikacija i validacija ključnih miRNK u CAKUT-u

4.3.1 Identifikacija ključnih miRNK u CAKUT-u CIA metodom

Primenom CIA metode bez nadzora zaključeno je da postoji jasno razdvajanje između kontrola i pacijenata sa CAKUT-om (Slika R9). Korišćenjem ove deskriptivne i eksploratorne tehnike, bilo je moguće vizuelno razdvojiti miRNK koje su potencijalno asocirane sa razlikom u genskoj ekspresiji ova dva fenotipa (Slika R9).

Primenom kombinacije CIA i BGA metode sistematično su određene miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na kontrole (Tabela R10). Primenom metode konzistencije je utvrđeno da 18 miRNK ima potencijalno povišenu ekspresiju u CAKUT-u u bar dva predikciona algoritma (Tabela R11).



Slika R9. Dijagram pokazuje parove osa koje su rezultat CIA bez nadzora. Podaci o predikciji miRNK vezujućih mesta, korišćeni za kreiranje dijagrama, su generisani TargetScanS predikcionim algoritmom. (A) Pokazuje projekciju i način grupisanja kontrolnih uzoraka i uzoraka sa CAKUT-om. (B) Pokazuje projekciju miRNK motiva. One miRNK koje su suprotno orijentisane u odnosu na grupu uzoraka sa CAKUT-om imaju potencijalno povišen nivo u tim uzorcima u odnosu na kontrole. Opisana pozicija miRNK asociраних са CAKUT-om u odnosu na kontrole je rezultat njihove prirode da snižavaju ekspresiju ciljnih gena. Opservacijom dijagrama zaključeno je da su miR-144, miR-101, miR-183 i miR-375 potencijalno asociране sa CAKUT-om, kao što su kasnije pokazale CIA/BGA analiza i metod konzistencije. Dijagram objavljen na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.

Tabela R10. miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u CAKUT-u u odnosu na kontrole na osnovu CIA/BGA analize izvršene sa pet različitih algoritama za predikciju miRNK vezujućih mesta zasnovanih na sekvenci

miRanda	TargetScan	TargetScanS	Pictar4way	Pictar5way
miR-194	miR-191	miR-139	miR-369-5p	miR-200a
miR-144	miR-423	miR-375	miR-191	miR-222
miR-577	miR-210	miR-101	miR-200a	miR-302c*
miR-802	miR-134	miR-183	miR-149	miR-205
miR-616	miR-375	miR-144	miR-215	miR-143
miR-376a	miR-30-3p	miR-1	miR-375	miR-210
miR-302c	miR-409-3p	miR-206	miR-148a	miR-221
miR-585	miR-431	miR-145	miR-16	miR-148b
miR-338	miR-224	miR-106	miR-148b	miR-21
miR-493-5p	miR-139	miR-17	miR-210	miR-148a
miR-30c	miR-495	miR-20	miR-222	miR-206
miR-379	miR-299-5p	miR-181	miR-23b	miR-338
miR-495	miR-148	miR-23	miR-23a	miR-199a*
miR-569	miR-152	miR-148	miR-340	miR-144
miR-607	miR-100	miR-152	miR-15b	miR-1
miR-520h	miR-99	miR-199	miR-136	miR-155
miR-520d	miR-433-5p	miR-141	miR-195	miR-152
miR-658	miR-183	miR-192	miR-101	miR-19b
miR-200b	miR-485-5p	miR-215	miR-15a	miR-19a
miR-450	miR-486	miR-10	miR-181b	miR-142-5p

miRNK koje se pojavljuju u 2 ili više predikciona algoritma su obeležene masnim slovima. Tabela objavljena u Jovanović i sar., 2016.

Tabela R11. miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u CAKUT-u u odnosu na kontrole, pre filtriranja sa CoMeTa predikcijama

miR-144	miR-139	miR-200a
miR-152	miR-148	miR-206
miR-210	miR-148a	miR-215
miR-375	miR-148b	miR-222
miR-1	miR-183	miR-338
miR-101	miR-191	miR-495

Podaci iz tabele objavljeni u Jovanović i sar., 2016.

miRNK dobijene kao rezultat u CIA analizi baziranoj na predikcionim algoritmima zasnovanim na sekvenci (Tabela R11) su dalje filtrirane preklapanjem sa rezultatima CIA analize bazirane na CoMeTa predikcijama (Tabela R12). Na taj način je filtrirana frakcija lažno pozitivnih rezultata. Nakon filtriranja, lista miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u CAKUT-u u odnosu na kontrole je znatno redukovana i bila je sačinjena od 7 miRNK (miR-144, miR-101, miR-375, miR-200a, miR-183, miR-495, miR-222). Sve miRNK osim miR-222 su bile u parovima koji su pripadali određenim miRNK zajednicama, a samim tim delile značajan deo ciljnih gena otkrivenih koekspresionom analizom. To su bile zajednice 4, 7 i 1 na osnovu miRCos metode (Gennarino i sar., 2012) (Tabela R13). Za eksperimentalnu validaciju su odabrane miRNK koje su bile bolje rangirane u zajednicama 4 i 1 (miR-144 i miR-183 redom). Obe miR iz zajednice 7 (miR-375 i miR-200a) su odabrane za eksperimentalnu validaciju zbog relativno visokog rangiranja (Tabela R13).

Tabela R12. miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u CAKUT-u u odnosu na kontrole na osnovu CIA/BGA analize izvršene sa CoMeTa predikcionim algoritmom

miR-108	miR-610	miR-331-5p	miR-302e	miR-1277
miR-369-5p	miR-485-3p	miR-146a	miR-518d-3p	miR-938
miR-139-3p	miR-603	miR-375	miR-142-5p	miR-10b
miR-941	miR-411	miR-548c-3p	miR-1297	miR-875-5p
miR-891a	miR-222	miR-200a	miR-144	miR-139-5p
miR-611	miR-495	miR-516a-5p	miR-656	miR-26b
miR-585	miR-639	miR-597	miR-802	miR-655
miR-553	miR-600	miR-141	miR-208a	miR-641
miR-189	miR-935	miR-492	miR-577	miR-302d
miR-551b	miR-374b	miR-1292	miR-191	miR-944
miR-551a	miR-518a-3p	miR-105	miR-643	miR-1258
miR-574-3p	miR-605	miR-103	miR-1185	miR-1224-5p
miR-1181	miR-377	miR-184	miR-146b-5p	miR-1250
miR-383	miR-374a	miR-1288	miR-372	miR-26a
miR-1273	miR-606	miR-559	miR-299-5p	miR-212
miR-720	miR-323-3p	miR-99b	miR-518e	miR-324-3p
miR-337-5p	miR-587	miR-142-3p	miR-568	miR-521
miR-517c	miR-101	miR-1180	miR-181c	miR-10a
miR-221	miR-1274b	miR-378	miR-630	miR-627
miR-660	miR-455-3p	miR-450b-5p	miR-194	miR-152

Tabela R13. miRNK čiji je nivo potencijalno povišen u CAKUT-u u odnosu na kontrole, nakon filtriranja CoMeTa podacima

miRNK	miRCos zajednica	CIA prosečno rangiranje
miR-144	4	7
miR-101	4	10,5
miR-375	7	4,3
miR-200a	7	2
miR-183	1	11
miR-495	1	12
miR-222	70	6,5

miRNK su presek rezultata CIA/BGA analize izvršene na predikcionim algoritmima koji se baziraju na sekvenci i CIA/BGA analize izvršene na CoMeTa podacima. Prosečno rangiranje predstavlja prosečno mesto miRNK na rang listama koje odgovaraju predikcionim algoritmima koji se baziraju na sekvenci, nakon BGA analize. Tabela objavljena na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.

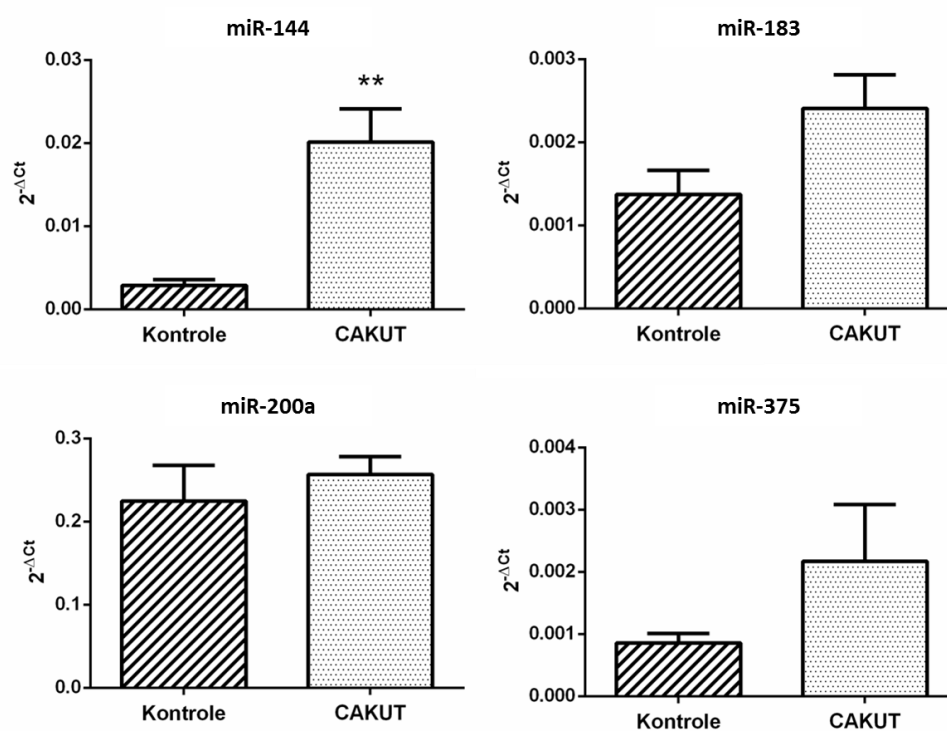
4.3.2 Validacija ekspresije najznačajnijih miRNK u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om i kontrola

Pošto u rezultatima CIA analize uglavnom nije postojala anotacija o 5'/3' lancu, eksperimentalna validacija ekspresije miRNK je rađena na zrelim formama miRNK koje su dominantno eksprimirane u ćelijama, tj. bez "*" u anotaciji (Kozomara i Griffiths-Jones, 2014). Odabrane zrele forme miRNK za eksperimentalnu validaciju su bile: miR-144-3p, miR-200a-3p, miR-375-3p i miR-183-5p. Nakon kvantifikacije relativnih nivoa miRNK, utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike u nivoima miR-144 između pacijenata sa CAKUT-om i kontrola (Man-Whitney U test, $p < 0,05$) (Tabela R14). Nije utvrđena statistički značajna razlika relativnih nivoa miR-200a, miR-183 i miR-375 (Tabela R14) između pomenutih grupa. Rezultati su grafički prikazani (Slika R10).

Tabela R14. Statistička analiza relativnih nivoa miRNK

miRNK	Fold Change	Man-Whitney U p vrednost (two tailed)
miR-144	5,7	0,005 **
miR-200a	1,1	0,7
miR-183	1,7	0,3
miR-375	2,7	0,9

Fold change- pokazuje koliko je puta nivo ispitivane miRNK viši u CAKUT-u u odnosu na kontrole. Mann-Whitney U test, ** $p \leq 0,01$. Tabela objavljena na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.



Slika R10. Prikaz rezultata kvantifikacije nivoa ispitanih miRNK. Na dijagramima su prikazane srednje vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ sa opsegom standardne greške za analizirane grupe. Razlika od kontrole Mann-Whitney U test, ** $p \leq 0,01$. Grafici objavljeni na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.

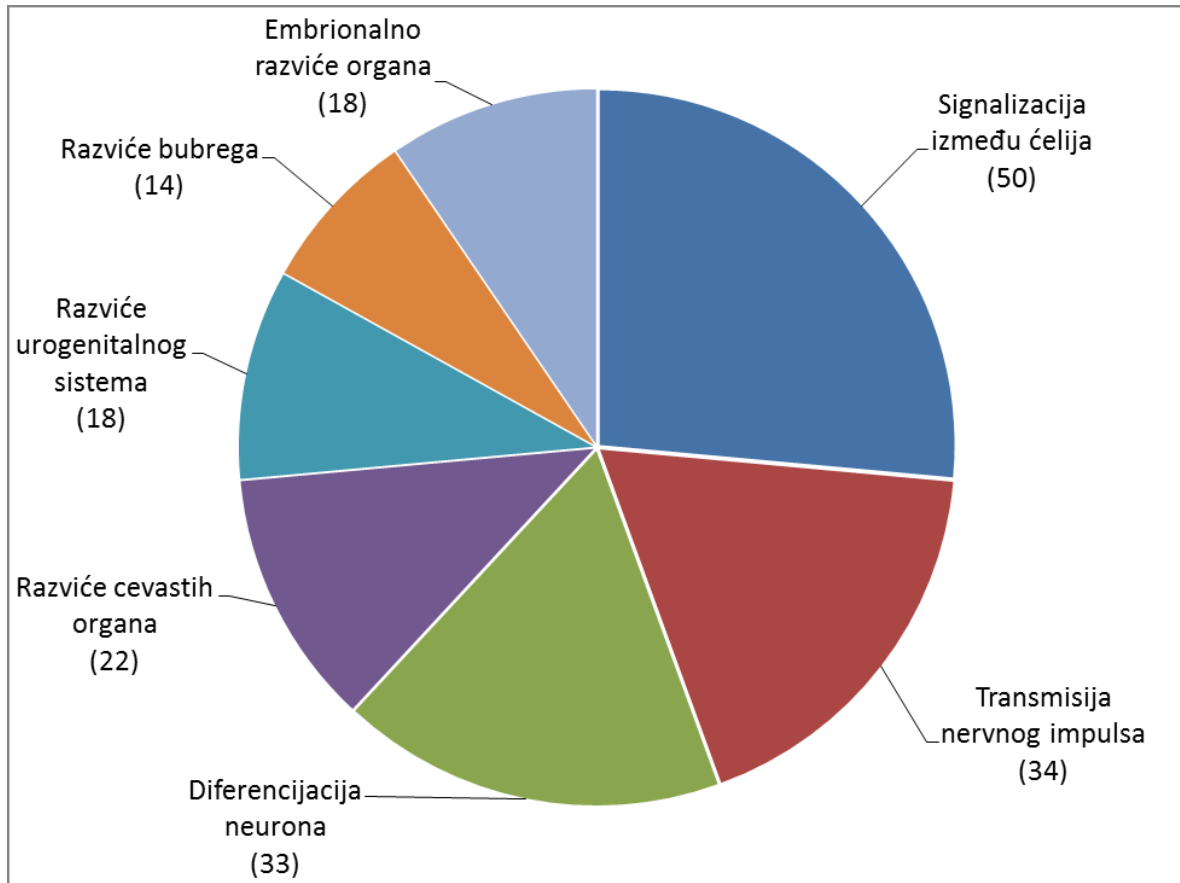
4.3.3. Određivanje bioloških funkcija miR-144 povezanih sa CAKUT-om

Ciljni geni za miR-144, na osnovu CoMeTa predikcije, su u prethodnoj studiji analizirani COOL analizom u cilju kreiranja grupa gena koje pokazuju visok nivo koekspresije (Gennarino i sar., 2012). COOL analiza je kao rezultat dala dve grupe sačinjene od 1024 i 511 gena, koji su potencijalni ciljni geni za miR-144 po CoMeTa predikciji. Na ovim grupama je izvršena GO ENA i utvrđeno je da je grupa od 511 gena asocirana sa bioloških procesima koji mogu učestvovati u nastanku CAKUT-a. Kao rezultat, dobijeno je 29 statistički značajnih GO anotacionih termina (Tabela R15). Na dobijenim GO rezultatima je izvršena selekcija najvažnijih termina koji opisuju biološke procese odgovorne za normalan razvoj i funkcionisanje bubrega i urinarnog trakta, prema biološkom smislu i informacijama iz literature (Slika R11).

Tabela R15. Statistički značajni rezultati GO ENA izvedene na grupi od 511 potencijalnih ciljnih gena za miR-144

GO ID	GO Termin	Broj	FE	p*
GO:0007267	Signalizacija između ćelija	50	2,69	0
GO:0048732	Razviće žlezda	21	5,02	0
GO:0045165	Determinacija ćelijske sudbine	21	4,88	0
GO:0019226	Transmisija nervnog impulsa	34	3,14	0
GO:0001655	Razviće urogenitalnog sistema	18	5,28	0
GO:0007268	Sinaptička transimsija	28	3,03	0
GO:0060541	Razviće respiratornog sistema	16	4,78	0
GO:0031328	Pozitivna regulacija ćelijskog biosintetičkog procesa	45	2,12	0,01
GO:0045935	Pozitivna regulacija metaboličkih procesa nukleobaza, nukleozida, nukleotida i nukleinskih kiselina	42	2,17	0,01
GO:0045944	Pozitivna regulacija transkripcije sa promotora za RNK polimerazu II	30	2,61	0,01
GO:0030900	Razviće prednjeg mozga	18	3,82	0,01
GO:0035295	Razviće cevastih organa	22	3,23	0,01
GO:0009891	Pozitivna regulacija biosintetičkog procesa	45	2,09	0,01
GO:0010557	Pozitivna regulacija procesa biosinteze makromolekula	43	2,12	0,01
GO:0030182	Diferencijacija neurona	33	2,43	0,01
GO:0006357	Regulacija transkripcije sa promotora za RNK polimerazu II	46	2,04	0,02
GO:0001822	Razviće bubrega	14	4,71	0,02
GO:0007423	Razviće čulnih organa	22	3,10	0,02
GO:0051173	Pozitivna regulacija metabolizma azotnih jedinjenja	42	2,11	0,02
GO:0010628	Pozitivna regulacija genske ekspresije	39	2,17	0,02
GO:0030324	Razviće pluća	14	4,57	0,02
GO:0006350	Transkripcija	99	1,52	0,03
GO:0007507	Razviće srca	21	3,15	0,03
GO:0045941	Pozitivna regulacija transkripcije	38	2,18	0,03
GO:0045893	DNK zavisna pozitivna regulacija transkripcije	34	2,30	0,03
GO:0030323	Razviće respiratornih cevčica	14	4,43	0,03
GO:0051254	Pozitivna regulacija RNK metabolizma	34	2,28	0,04
GO:0001501	Razviće skeletnog sistema	26	2,63	0,04
GO:0048568	Razviće organa embriona	18	3,38	0,05

GO ID – Identifikacioni broj GO biološkog procesa; Broj – broj gena od ukupno 511, uključenih u određeni biološki proces; FE – engl. *Fold Enrichment*; * – hipergeometrijski test sa Bonferroni korekcijom. Tabela objavljena na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.



Slika R11. Dijagram statistički značajnih bioloških procesa iz GO ENA urađene na grupi ciljnih gena za miR-144 po CoMeTA predikciji, koji mogu biti odgovorni za nastanak CAKUT-a. Dijagram pokazuje i relativni odnos broja gena (u zagradama) asociranih sa GO anotacionim terminima (biološki proces). Dijagram objavljen na engleskom jeziku u Jovanović i sar., 2016.

5. Diskusija

ČAKUT je u osnovi 30-50% slučajeva terminalne bubrežne insuficijencije (Harambat i sar., 2012), pa je pravovremena intervencija odgovarajućom terapijom veoma važna u cilju prevencije ili odlaganja gubitka funkcije bubrega koja vodi hemodijalizi i transplantaciji bubrega (Harambat i sar., 2012). Međutim, pokazano je da farmakološki tretman utišavanja jednog molekula nije uvek dobra strategija za tretman bolesti zbog postojanja različitih, pozitivnih i negativnih efekata, u različitim stadijumima opstruktivne nefropatije (Bascands i sar., 2005). Zato je u lečenju različitih oblika ČAKUT-a važan personalizovani pristup koji uključuje sistemski, molekularni kontekst bolesti. Međutim, zbog kompleksne genetičke arhitekture ČAKUT-a i redukovane penetrabilnosti opisanih uzročnih varijanti, lista gena kandidata i molekularnih mehanizama odgovornih za nastanak i progresiju bolesti je daleko od kompletne (^{a,b}Nicolaou i sar., 2015). Proces karakterizacije gena uključenih u abnormalno razviće bubrega i urinarnog trakta u animalnim modelima je napravio veliki pomak u istraživanju ČAKUT-a (Renkema i sar., 2011; Hartwig i sar., 2010; Blake i Rosenblum, 2014), ali ove studije takođe imaju i svoja ograničenja, kao što je otežana interpretacija rezultata zbog kompenzacije utišanog gena produktima srodnih gena (Bascands i sar., 2005). Drugi problem kod istraživanja ČAKUT-a korišćenjem genetički modifikovanih životinja je nemogućnost ispitivanja reverzibilnosti patologije (Bascands i sar., 2005). Takođe, iako animalni modeli omogućavaju preciznu manipulaciju ključnim faktorima za razviće urinarnog sistema, neophodne su validacione studije u ČAKUT-u kod čoveka. Analizom genske ekspresije u ćelijskoj liniji bubrežnih mezenhimskih ćelija čoveka, stimulisanih nefrogenetskim faktorima pacova, identifikovani su geni koji do tada nisu bili opisani u razviću bubrega (Price i sar., 2007). Međutim, dosadašnje *ex vivo* studije ekspresije gena u tkivu ČAKUT-a čoveka su isključivo bazirane na istraživanju ekspresije gena kandidata pa je teško zaključiti koje su globalne molekularne interakcije bile deregulisane izmenjenom ekspresijom gena kandidata (Nishimura i sar., 1999; Yang i sar., 2000; Yang i sar., 2003; ^aKnerr i sar., 2001; ^bKnerr i sar., 2001; Stankovic i sar., 2010). Kao

nedostajuća karika u lancu istraživanja molekularnih procesa uključenih u patogenezu i progresiju CAKUT-a kod čoveka, u ovoj studiji su ispitane razlike u ekspresiji celokupnog genoma u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om i zdravih kontrola kao i sistemski efekat zabeleženog ekspresionog profila DEG. Takođe, u ovoj studiji je prvi put ispitana ekspresija miRNK u tkivu CAKUT-a kod čoveka, kao i njihov potencijal da izmene ekspresiju ključnih gena do te mere da postane potencijalno odgovorna za nastanak bolesti (Jovanovic i sar., 2014; Jovanovic i sar., 2016).

5.1. Diferencijalno eksprimirani geni u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u poređenju sa tkivom uretera zdravih kontrola

5.1.1. Fiziološki i patološki biološki procesi i molekularni putevi statistički značajno asocirani sa diferencijalno eksprimiranim genima

Hijerarhijskim klasterovanjem je potvrđeno da ekspresioni profil 78 DEG jasno razdvaja pacijente sa CAKUT-om od kontrola (Slika R1) što ih čini važnim kandidatima za biološke markere ove bolesti. Analizom DEG korišćenjem ručno održavane i jedne od najsavremenijih i najkompleksnijih bioloških baza znanja (Ingenuity® Knowledge Base) zaključeno je da su DEG asocirani sa urođenim anomalijama kao i povredama i abnormalnostima organizma što potvrđuje njihovu ulogu u urođenim anomalijama urinarnog sistema (Slika R2). Patofiziološki procesi u nervnom sistemu takođe su asocirani sa DEG (Slika R2) i kao takvi od velikog interesa u ovoj studiji jer su u saglasnosti sa rezultatima GO i dosadašnjim literaturnim podacima koji opisuju funkcionalno i razvojno jedinstvo nervnog i urinarnog sistema (Stoll i sar., 2011) (Slika R2).

GO biološki proces asociran sa najvećim brojem DEG je bio signalna transdukcija povezana sa receptorima na površini ćelije (Tabela R3). Organogeneza metanefrosnog bubrega i urinarnog trakta je koordinisana kompleksnim interakcijama velikog broja transkripcionih faktora, faktora rasta i intraćelijskih signalnih molekula koji su uključeni u procese signalne transdukcije i kolektivno označeni kao geni razvića bubrega (engl. *Renal Developmental Genes* – RDG) (Costantini, 2006; Dressler, 2009; Reidy i Rosenblum, 2009; Mendelsohn,

2009). Tokom razvića urinarnog sistema, signali iz metanefričkog mezenhima indukuju pupljenje Volfvog kanala i kontrolišu smer rasta ureterovog pupoljka (Cacalano i sar., 1998; Shakya i sar., 2005; Grieshammer i sar., 2004), kao i njegovo grananje i formiranje sistema sabirnih kanala (Majumdar i sar., 2003). Sa druge strane, kao odgovor na signale ureterovog pupoljka, dolazi do indukcije kondenzacije ćelija metanefričkog mezenhima oko vrhova ureterovog pupoljka i formiranja progenitorskih ćelija nefrona ili ćelija bubrežne strome (Aufderheide i sar., 1987). Uzevši u obzir veliki broj studija koje su na genetičkim modelima miša bavile izučavanjem molekularne kontrole razvića urinarnog sistema, sistematizovanih od strane autora (Blake i Rosenblum, 2014), može se zaključiti da poremećaj u signalnim putevima koji dovodi do izmenjene orijentacije Volfvog kanala, indukcije ureterovog pupoljka i morfogeneze bubrega u razviću rezultuje nastankom CAKUT-a (Blake i Rosenblum, 2014). Aberantna signalizacija može inhibirati indukciju razvića bubrega što rezultuje bubrežnom aplazijom, ili obrnuto, indukovati više ureterovih pupoljaka što dovodi do dupliranja/multipliciranja uretera na jednom bubregu, VUR-a i opstrukcija (Blake i Rosenblum, 2014). Rezultat koji pokazuje da je čak 15 od 78 DEG u našoj studiji uključeno u procese signalne transdukcije dodatno potvrđuje teoriju da usklađena signalizacija igra centralnu ulogu u razviću urinarnog sistema (Song i Yosypiv, 2011). Izmenjena signalizacija u CAKUT-u je takođe potvrđena i IPA analizom kroz poremećaje u kanonskim putevima: komunikacija između dendritičnih i NK ćelija, izmenjena signalizacija T i B ćelija u reumatoidnom artritisu i IL-17A signalizacija u fibroblastima (Slika R3).

Rezultati GO analize su takođe potvrdili razvojno i funkcionalno jedinstvo urinarnog i nervnog sistema asociacijom DEG sa neurobiološkim procesima: regulacija neuroloških procesa, regulacija transmisije nervnog impulsa, regulacija sinaptičke transmisije, odgovor na mehanički stimulus (Tabela R3). Razvojno jedinstvo ova dva organska sistema je opisano kroz fenomen da tkivo mozga i kičmene moždine pileta, kada je u kontaktu sa metanefričkim mezenhimom, može indukovati tranziciju mišijih mezenhimskih u epitelijalne ćelije i tubuligenezu *in vitro* (Sariola i sar., 1989). Na taj način autori su pokazali da faktori odgovorni za

proces diferencijacije metaferičkog mezenhima nisu specifični samo za ureterov pupoljak (Sariola i sar., 1989). Samim tim, poremećaj u biološkim procesima karakterističnim za nervni sistem u ovoj studiji može ukazati i na poremećaje u razviću urinarnog trakta zbog zajedničkih razvojnih molekularnih puteva, što je u skladu sa podacima koji opisuju bubrežne malformacije kao neke od najčešćih anomalija asociranih sa različitim defektima nervnog sistema, kao što su npr. defekti nervne cevi (Stoll i sar., 2011).

Zastupnici neurogene teorije poremećene peristaltike u opstrukciji tvrde da intrinzičke opstrukcije urinarnog trakta imaju funkcionalno poreklo uslovljeno abnormalnom inervacijom (Uson i sar., 1968; Johnston i sar., 1977). U najvećem broju studija, efekat abnormalne inervacije uretera na nastanak aperistaltičnog, opstruktivnog segmenta je ispitivan upoređivanjem normalnog i opstruktivnog tkiva, kao i intrinzičkih i ekstrinzičkih opstrukcija na nivou UPS histološkim i imunohistohemijskim metodama. Međutim, iako se studije slažu da je defekt u inervaciji povezan sa nastankom opstrukcija uretera, histološki rezultati studija nisu u potpunosti saglasni. Neke studije opisuju mišićnu hipertrofiju i hiperplaziju kao i povećanje ekstraćelijskog matriksa asocirane sa povećanom spontanom aktivnošću i odgovorom na stimulaciju (Santis i sar., 2000), ili sa disfunkcijom neurona (Demirbilek i sar., 2006; Gunduz i sar., 2013). Takođe je zabeleženo intenzivnije imunohistohemijsko bojenje nervno-mišićnih sinapsi kod UPS sa opstrukcijama u odnosu na UPS bez opstrukcija (Demirbilek i sar., 2006; Gunduz i sar., 2013). Međutim, suprotno pomenutim studijama, postoje studije koje opisuju smanjenje broja nervnih vlakana i sinaptičkih vezikula u mišićnom sloju kod UPS opstrukcija u poređenju sa normalnim UPS, kao i sniženi nivo iRNK faktora rasta nerava (engl. *Nerve Growth Factor* – NGF), odgovornog za razviće aksona i formiranje sinapsi (Wang i sar., 1995). Autori predlažu da smanjenje broja nervno-mišićnih sinaptičkih vezikula kod opstrukcija UPS može biti ključni faktor u poremećaju transmisije peristaltičkih talasa i poremećaju relaksacije uretera pod dejstvom mehaničkog stimulusa (Wang i sar., 1995), što je u saglasnosti sa rezultatima GO analize (Tabela R3). Postoje studije koje predlažu i kombinovanu neurogenu i miogenu teoriju nastanka opstrukcija (Murakumo i sar., 1997;

Kajbafzadeh i sar., 2006). Po ovoj teoriji smanjenje broja nervnih vlakana u mišićnim slojevima zida uretera rezultuje disfunkcijom, atrofijom i apoptozom mišićnih vlakana i akumulacijom intercelularnog i intersticijalnog kolagena u mišićnim slojevima uretera (Kajbafzadeh i sar., 2006). Guste depozicije kolagena ograničavaju pokretljivost miocita i rezultuju gubitkom elastičnosti uretera i otežanim protokom urina (Kajbafzadeh i sar., 2006). Ovako nastale primarne urođene opstrukcije mogu dovesti i do niza ozbiljnih, životno ugrožavajućih sekundarnih komplikacija kao što su tubularna atrofija, tubulointersticijalna fibroza i hronična bubrežna insuficijencija (Boor i sar., 2010). Opisani patološki procesi se mogu sekundarno javiti i u drugim delovima urinarnog sistema, gde usled opstrukcija u protoku urina dolazi do dilatacije i oštećenja bubrežne karlice i bubrežnih tubula i aktivacije apoptotskih i fibrotskih procesa (Kajbafzadeh i sar., 2006; Boor i sar., 2010).

Inervacija uretera i kontrakcija uretera su ispitivani u zidu uretera na osnovu imunohistohemijskih markera i nivoa iRNK različitih komponenti nervnog sistema: sinaptofizin (marker nervno-mišićne sinapse), S-100 (marker nervne ćelije), PGP 9,5 (neuron specifični protein) i CD-117 (marker intersticijalnih Kajalovih ćelija); komponenti nitrergičke i peptidergičke inervacije: neuralna sintetaza azot oksida (nNOS), neuropeptid Y (NPY), supstanca P, prostaglandini. Takođe su ispitivane i komponente regulatori peristaltike glatkih mišića: konstriktor glatkih mišića endotelin 1 (ET-1), relaksirajući peptid adrenomedulin (AM), bradikinin, angiotenzin II (AngII). Navedene komponente u različitim studijama pokazuju razlike u distribuciji i ekspresiji između opstruktivnih i zdravih UPS (Demirbilek i sar., 2006; Gunduz i sar., 2013; Wang i sar., 1995; Harish i sar., 2003, Metzger i sar., 2004; Balikci i sar., 2015; Koleda i sar., 2012; ^aKnerr i sar., 2001; ^bKnerr i sar., 2001; Santis i sar., 2000; Santis i sar., 2003), ali rezultati nisu uniformni. Zna se da ureter normalno funkcioniše kao scintilacioni glatki mišić gde se ekscitacija prenosi sa ćelije na ćeliju preko ćelijskih veza nakon oslobađanje neurotransmitera sa nervnih završetaka (Burnstock G, 1970), ali molekularni kontraktilni mehanizam i dalje nije sasvim razjašnjen (Vargiu i sar., 2015). Osim simpatičke i parasimpatičke neuralne regulacije (Murakami i sar., 2000; Canda i

sar., 2007) postoji i nonadrenergička i nonholinergička nontransmitterska regulacija neuromodulatorima (^aKnerr i sar., 2001; ^bKnerr i sar., 2001; Santis i sar., 2000; Santis i sar., 2003; Cole i sar., 1988). Biološki procesi rezultati GO analize ove studije (regulacija neuroloških procesa, regulacija transmisije nervnog impulsa, regulacija sinaptičke transmisije i odgovor na mehanički stimulus) su u saglasnosti sa pomenutim studijama i saznanjima da mehanizam miogene i neurogene kontrole glatkomišićne peristaltike uretera postoji i da je deregulisan u CAKUT-u. Pošto se rezultati opisanih studija temelje uglavnom na imunohistohemijskim parametrima i ispitivanju pojedinačnih molekula, metode primenjene u našem radu, koje analiziraju ekspresiju celokupnog genoma, daleko su opsežnije i sveobuhvatnije i predstavlja važnu prekretnicu povezivanja prethodnih i daljih istraživanja CAKUT-a. Ostaje pitanje da li poremećaj u neurobiološkim procesima koji smo utvrdili postnatalno može biti i indikator razvojnog poremećaja miogene i neurogene kontrole glatkomišićne peristaltike uretera.

Apoptoza (programirana ćelijska smrt) predstavlja takođe biološki proces čija je funkcija izmenjena u tkivu uretera dece sa CAKUT-om u poređenju sa tkivom uretera zdravih kontrola na osnovu GO analize DEG (Tabela R3). Danas je poznato da je u razviću bubrega i urinarnog trakta veoma važan balans između pro-apoptotskih i anti-apoptotskih mehanizama (Stewart i Bouchard, 2011, dos Santos Junior i sar., 2014). Kontrolisana apoptoza je esencijalan proces ne samo za eliminaciju oštećenih ćelija ili regulaciju broja ćelija, već i za uklanjanje tkiva tokom polne determinaciju (uklanjanje Milerovog kanala kod dečaka i Volfvog kanala kod devojčica) (Stewart i Bouchard, 2011; Kobayashi i Behringer, 2003), kao i za oblikovanje organa u finalne funkcionalne jedinice (Jacobson i sar., 1997; Stewart i Bouchard, 2011). Kod miševa nokauta za AT2 receptor (AT2R), čija je aktivacija neophodna za normalnu apoptozu nediferenciranih mezenhimskih ćelija koje okružuju ureter u razviću, zabeležena je pojava čitavog spektra fenotipova označenih kao CAKUT (Nishimura i sar., 1999). Iz tog razloga je postavljena teorija da izostanak pravovremene apoptoze nediferenciranih mezenhimskih ćelija ometa inicijalnu interakciju ureterovog pupoljka i kondenzovanog mezenhima (metanefrička blastema) (Pope i sar., 1999). To rezultuje ektopičnim (kaudalnim)

pupljenjem uretera, što dalje dovodi do abnormalnog položaja UVS i nastanka VUR-a. Sa druge strane, kaudalno napredovanje ureterovog pupoljka dovodi do nedostatka kontakta sa određenim delom metanefričke blasteme što dovodi do razvića hipoplastičnog ili displastičnog bubrega (Pope i sar., 1999). Korišćenjem modela miša nokauta za fosfataze iz familije LAR, Ptpns i Ptpnf, odgovornih za indukciju apoptoze zajedničkog nefrotičkog kanala u procesu maturacije distalnog uretera, je dokazano da izostanak apoptoze neophodne za odvajanje uretera od Volfovog kanala i usađivanje u mokraćnu bešiku može dovesti do hidrouretera i ureterocela (Uetani i sar., 2009). Miševi sa mutacijama koje dovode do sniženja aktivnosti Ret/Gdnf signalnog puta razvijaju opstrukcije urinarnog trakta koje bi mogle biti rezultat nemogućnosti pravilnog remodelovanja zajedničkog nefrotičkog kanala (Mendelsohn, 2009). Apoptoza je u razviću urinarnog sistema takođe važna i kod otvaranja lumena uretera koji se kod miša u dešava u E15 trenutku razvića embriona (Uetani i sar., 2009) pa poremećaj u ovom procesu može dovesti do opstrukcija. Sazrevanje bubrežnog parenhima u razviću zahteva uklanjanje septi koje predstavljaju prostore između Henleovih petlji, sabirnih kanalića i kanala, ispunjene nediferenciranim mezenhimskim ćelijama. Samim tim, defekt u apoptozi može dovesti i do displazija koje karakteriše mnoštvo nediferenciranih intersticijalnih ćelija koje popunjavaju interlobarne i interlobularne prostore (Pope i sar., 1999). Iz svega opisanog se može zaključiti da poremećaj u ekspresiji gena uključenih u apoptotske procese može dovesti do čitavog fenotipskog spektra CAKUT-a u ranom razviću.

Od statistički značajnih kanonskih puteva, asociраних са DEG IPA softverom, biosinteza heparan sulfata (Slika R3) takođe predstavlja važan proces jer je heparan sulfat neophodan za normalno razviće urinarnog sistema (Steer i sar., 2004; Davies i sar., 1995; Lelongt i sar., 1988). Naime, heparan sulfat je ključni ligand za faktore koji stimulišu rast ureterovog pupoljka u procesima pupljenja i grananja uretera, omogućavanjem formiranja gradijenta morfogena duž epitela uretera (Steer i sar., 2004). Takođe, heparan sulfat igra važnu ulogu u održavanju molekularne arhitekture glomerularnog ekstraćelijskog matriksa i može uticati na glomerularnu permselektivnost (Lemos i sar., 2013). Promene u selektivnoj

permeabilnosti glomerula rezultuju proteinurijom (Raats i sar., 2000), koja predstavlja glavni marker oštećenja glomerula i koja je u direktnoj korelaciji sa gubitkom bubrežne funkcije (Burton i Harris, 1996). Iz tog razloga, poremećaj u biosintetičkim putevima ovih molekula može imati velike posledice na razvoj i fiziologiju bubrega i urinarnog trakta i zahtevaju detaljnije istraživanje u CAKUT-u kao faktori koji primarno mogu dovesti do patoloških poremećaja u urinarnom sistemu. Međutim, poremećaj u biosintezi heparan sulfata može uticati i na razvoj inflamacije. Na osnovu njihove sposobnosti da interaguju sa hemokinima, molekuli heparan sulfata učestvuju u formiranju retencije i lokalizovane visoke koncentracije hemokina duž ekstraćelijskog matriksa i endotela krvnog suda (Proudfoot i sar., 2003; Witt i Lander, 1994, Lortat-Jacob i sar., 2002; Hoogewerf i sar., 1997), koji aktiviraju i koordinišu migraciju leukocita na mesto inflamacije (Baggiolini, 1998).

Inflamatorni procesi (imuni odgovor, hemotaksa) su takođe bili asocirani sa DEG GO analizom (Tabela R3). Hronična inflamacija predstavlja jedan od ključnih procesa koji vode fibrozi bubrega nakon opstrukcije, što dovodi do gubitka bubrežne funkcije i dijalize i transplantacije (Choi i sar., 2000; Klahr i Morrissey, 2002). Čak je i predložena terapija blokade molekula inflamacije (Morrissey i Klahr, 1999; Cao i sar., 2000; Ruiz-Ortega i sar., 2002; Esteban i sar., 2004) i monitoring medijatora inflamacije koji može pomoći u lečenju postnatalnih uropatija kao i u detekciji pacijenata sa visokim rizikom za razvoj hronične bubrežne insuficijencije (Simoës e Silva i sar., 2013). U ovoj studiji, obzirom da je urađena na pacijentima nakon rođenja, možemo ispitivati samo efekat inflamacije na nastanak i progresiju CAKUT-a sekundarnog karaktera, tj. odgovor na već prisutnu opstrukciju i malformaciju, a da li je pak inflamacija primarnog karaktera u slučajevima povećanog oksidativnog stresa i hipoksije *in utero* (Salzano i sar., 2014; Wilkinson i sar., 2015), može se ispitivati u nekim budućim studijama. Ako se uzme u obzir teorija da embrionalni razvoj nije završen nego je produžen kod CAKUT-a (Yang i sar., 2000; Yang i sar., 2003), možda se rezultati ove studije mogu tumačiti i kao primarni.

Međutim, ako se poremećaji neurobioloških, apoptotskih i inflamatornih procesa sagledaju u integraciji, dodatno se potvrđuju rezultati dosadašnjih studija koje ove mehanizme opisuju kao ključne za nastanak opstrukcije uretera (Murakumo i sar., 1997; Kajbafzadeh i sar., 2006). Naime, pomenuto je da poremećaj rasta nerava može dovesti do endogenih opstrukcija uretera u nivou UPS kroz indukciju apoptoze miocita uretera mehanizmom sličnim neuropatskoj denervaciji i defektnoj inervaciji (Murakumo i sar., 1997; Kajbafzadeh i sar., 2006). Apoptoza miocita, koja je rezultat poremećaja inervacije, ima kauzativnu ulogu u indukciji posledičnih inflamatornih i fibrotskih promena u zidu uretera koje se karakterišu povećanjem procenta kolagenih i elastinskih vlakana kod opstrukcija u nivou UPS kod čoveka (Kajbafzadeh i sar., 2006). Takođe, utvrđenom ekspresijom AT2R u ureterima u humanom CAKUT-u postnatalno potvrđeno je prisustvo inflamacije (Stankovic i sar., 2010) i pro-apoptotskih signala (Nishimura i sar., 1999). Inflamacija i apoptoza dovode do infiltracije makrofaga koji fagocitozom uklanjaju produkte apoptoze i koji sintetišu jedan od glavnih pro-fibrotskih medijatora, TGF- β (Fadok i sar., 1998). Predloženo je da povećan nivo ekspresije TGF- β indukuje taloženje kolagena od strane fibroblasta (Lijnen i Petrov, 2002). Guste depozicije i abnormalna kompozicija kolagena koja se ogleda u poremećaju odnosa između kolagena tipa I i tipa III u mišićnom sloju uretera ograničavaju i ometaju kontrakciju miocita, što rezultuje smanjenjem elastičnosti i opstrukcijom uretera (Kim i sar., 2000; Yoon i sar., 1998).

Faktori odgovorni za indukciju inflamacije i apoptoze, uključujući hipoksiju, ishemiju, aktivaciju citokina, faktore rasta, angiotenzin II i reaktivne vrste kiseonika, takođe nastaju i u tkivu bubrega kod hroničnih opstruktivnih uropatija i mogu inicirati apoptozu tubularnih i intersticijalnih bubrežnih ćelija kod veštački indukovanih opstrukcija uretera miša (Truong i sar., 2001). Takođe, u bubregu miša sa indukovanom opstrukcijom, u poređenju sa kontrolnim i kontralateralnim bubrezima, zabeležen je povišen nivo iRNK molekula povezanih sa apoptozom tubularnih i intersticijalnih ćelija bubrega sa udruženom fibrozom i infiltracijom inflamatornih ćelija (Choi i sar., 2000). Miševi heterozigoti i homozigoti za mutirani p53 koji se ne ekspimiraju na nivou iRNK i proteina, pokazuju atenuaciju apoptoze

tubularnih i intersticijalnih ćelija kod veštački indukovanih kompletnih ligacija jednog uretera u nivou UPS u poređenju sa *wild-type* miševima (Choi i sar., 2001). Ovaj rezultat sugerije da je indukcija tubulointersticijalne apoptoze izazvane opstrukcijom, i udružena infiltracija inflamatornih ćelija i proliferacija fibroblasta takođe rezultat aktivacije i p53 (Choi i sar., 2001). Fibroza tubulointersticijalnog kompartmenta, koja je često praćena inflamacijom predstavlja glavni uzrok progresivnog gubitka bubrežne funkcije (Klahr i sar., 1988; Eddy, 1996; Choi i sar., 2000; Klahr i Morrissey, 2002). Kao što je slučaj kod opstrukcija uretera, prihvaćeno je da TGF- β predstavlja ključni molekul za nastanak tubulointersticijalne fibroze u animalnim modelima sa unilateralnim opstrukcijama uretera (engl. *Unilateral Ureteral Obstruction* - UUU) (Miyajima i sar., 2000). Opšte je mišljenje da je TGF- β uključen u bubrežnu fibrozu indukovanu sa UUU na osnovu njegovog kapaciteta da indukuje produkciju ekstraćelijskog matriksa od strane fibroblasta (Verrecchia i Mauviel, 2002), diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste (Verrecchia i Mauviel, 2002), hemotaksu makrofaga (Ashcroft i sar., 1999) i apoptozu (Yang i sar., 2002; Inazaki i sar., 2004). Iz svega opisanog se može zaključiti da identifikovane promene u biološkim procesima, indukovane izmenjenom ekspresijom gena u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u poređenju sa zdravim tkivom, oslikavaju većinu patoloških procesa opisanih u dosadašnjim animalnim studijama patologije urinarnog sistema. Novina u ovom polju je do sada neistražena systemska interakcija opisanih DEG koji na najkoncizniji način rekapituliraju dosadašnja saznanja o CAKUT-u na nivou celokupnog urinarnog sistema. Takođe je važno napomenuti da rezultati koji su u skladu sa dosadašnjim animalnim studijama po prvi put oslikavaju sinergiju opisanih patoloških procesa na molekularnom nivou u tkivu čoveka.

GO analizom molekularnih funkcija asociраних са DEG je otkriveno da funkcija vezivanja kadmijumovih jona ima veoma visok FE (Tabela R3), zbog snižene ekspresije 3 izoforme metalotioneina u CAKUT-u (*MT1G*, *MT1M* i *MT1X*) (Tabela R1). Familija metalotioneina (MT) predstavlja grupu cisteinom-bogatih proteina male molekularne mase (Klaassen i sar., 1999). U studiji u kojoj su korišćeni miševi nokauti za *MT1/2* je pokazano da, iako je akumulacija

injektovanog kadmijuma u bubrezima miševa nokauta bila veća samo 10% u odnosu na akumulaciju injektovanog kadmijuma u bubrezima *wild-type* miševa, nokauti su bili podložniji kadmijumom-indukovanoj nefrotoksičnosti (Liu i sar., 1998). MT formira kompleks sa kadmijumom i predstavlja važan intracelularni faktor u zaštiti od nefrotoksičnosti indukovane elementarnim kadmijumom i oksidativnim stresom (Liu i sar., 1998). Nakon izloženosti kadmijumu, većina molekula kadmijuma se vezuje za albumin u cirkulaciji i tako nastao kompleks metal-protein preuzimaju ćelije jetre (Yang i Shu, 2015). U jetri MT vezuje kadmijum, kao protektivni mehanizam, u cilju izolacije ksenobiotičkog kadmijuma. Kadmijum – metalotionein (Cd-MT) kompleks se nakon toga oslobađa u cirkulaciju, putuje do bubrega, i u nivou glomerula filtrira i reapsorbuje od strane epitelnih ćelija proksimalnih tubula endocitozom. Relokacija Cd-MT kompleksa iz jetre u bubreg je dokazana transplantacijom jetri pacova hronično tretiranih kadmijum hloridom u kontrolnu grupu pacova (Chan i sar., 1993), gde je opisano značajno povećanje nivoa kadmijuma i MT u bubrezima transplantiranih životinja, dok su nivoi kadmijuma i MT u transplantiranoj jetri opadali u zavisnosti od proteklog vremena. Reapsorbovani Cd-MT kompleks rapidno degraduje po ulasku u epitelnu ćeliju proksimalnih tubula (Klaassen i sar., 1999). Slobodni kadmijum se tada u citoplazmi vezuje za MT sintetisan od strane epitelnih ćelija tubula što sprečava nastanak kadmijumom indukovano oksidativnog stresa (Yang i Shu, 2015; Rani i sar., 2014). Predloženo je da je oštećenje bubrežnog tkiva sprečeno sve dok tkivo bubrega može sintetisati dovoljno MT (Friberg, 1984).

Pušenje predstavlja primarni izvor izloženosti kadmijumu u opštoj populaciji, te iz tog razloga kadmijum predstavlja veoma važan problem za javno zdravlje (Prozialeck i Edwards, 2010). Kakva je bila izloženost fetusa kadmijumu i da li je možda uzrokovana pušenjem u trudnoći, ne može se reći na osnovu ove studije jer podaci o pušačkom statusu trudnica nisu bili poznati. Dobijena snižena ekspresija protektivnih molekula u CAKUT-u svakako može predstavljati faktor rizika za nastanak CAKUT-a usled niskog protektivnog kapaciteta u urogenitalnom tkivu, jer je poznato da u detoksifikacionoj funkciji MT može doći do zasićenja, a samim tim i do bubrežnih oštećenja visokim dozama slobodnog kadmijuma u tkivu

bubrega (Yang i Shu, 2015). Ovaj rezultat može predstavljati polaznu tačku u budućim studijama jer kompleksnost CAKUT-a umnogome zavisi i od modifikujućih uticaja faktora spoljašnje sredine (Nicolaou i sar., 2015). Takođe je važno ove rezultate validirati na kontrolnim uzorcima uparene dobi jer je u novijim studijama pokazano da povećanje ekspresije MT u tkivu bubrega sa starenjem predstavlja mehanizam odbrane od oksidativnog stresa (Leierer i sar., 2016).

5.1.2. Biološki smisao molekularnih mreža i gena odabranih za njihovu validaciju

U studiji je okarakterisano sedam glavnih molekularnih mreža u CAKUT-u, sačinjenih od subsetova DEG (Tabela R4), od kojih su četiri eksperimentalno validirane kao mreže od najvećeg interesa za relevantnu patologiju (Slika R4, R5, R6 i R7). Za validaciju ekspresije na nivou iRNK odabrani su geni čiji produkti na osnovu literature učestvuju u patološkim procesima u urinarnom sistemu ali nisu do sada istraživani u CAKUT-u. Molekuli i njihove interakcije, koji formiraju mreže od interesa, su od velikog značaja jer u dosadašnjim studijama nije okarakterisana mreža ključnih molekularskih interakcija u CAKUT-u dobijena analizom ekspresije celokupnog genoma. Iz tog razloga dizajn budućih funkcionalnih studija bi trebao da se zasniva na informacijama o ključnim interakcijama, sadržanim u ovim mrežama.

Molekularna mreža 1 (Slika R4) je sadržala gene čija je funkcija povezana sa ćelijskom morfologijom, humoralnim imunim odgovorom i razvićem i strukturom limfoidnog tkiva. Poremećaj u razvojnim procesima, ali i u fiziološkim ćelijskim procesima postnatalno može rezultovati morfološkim promenama ćelija koje mogu doprineti razvoju CAKUT-a. Mreža je validirana proverom ekspresije 3 gena koji su članovi ove mreže (*RASD1*, *PROM1* i *LCN2*), na nivou iRNK. Produkt *RASD1* gena je aktivator G-protein signalnog puta u neuronima, važan za neuronalnu signalnu transdukciju (Fang i sar., 2000), odgovornu za normalno funkcionisanje urinarnog trakta (Kajbafzadeh i sar., 2006). Uključen je u procese ćelijskog rasta, diferencijacije i transformacije (Vaidyanathan i sar., 2004), koji predstavljaju važne

processe prilikom rasta i grananja ureterovog pupoljka (Renkema i sar., 2011). Snižena ekspresija ovog gena može značajno uticati na pomenute procese. Međutim, uzrok snižene ekspresije *RASD1* gena u CAKUT-u još uvek nije poznat. Drugi validirani gen, *PROM1*, je u dosadašnjim studijama korišćen u identifikaciji bubrežnih progenitorskih ćelija koje nastaju tokom epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (EMT) (Sagrinati i sar., 2006, Schwartz i sar., 2013). Samim tim, povišena ekspresija *PROM1* u epitelnim ćelijama je marker akutnog tubularnog i glomerularnog oštećenja (Schwartz i sar., 2013). Budući da je pozitivni ekspresioni signal *PROM1* detektovan u urinarnom traktu, neophodno je u budućim studijama ispitati koja je uloga ovog markera u CAKUT-u. Može se pretpostaviti da povećanje ekspresije *PROM1* u CAKUT-u koje smo detektovali u urinarnom sistemu kao i u gore navedenim radovima ukazuje na formiranje progenitorskih ćelija koje učestvuju u EMT u ureterima. Proteinski produkt trećeg validiranog gena iz mreže 1, *LCN2*, predstavlja važan faktor u odbrani urinarnog trakta od patogena, inhibirajući rast bakterija vezivanjem za bakterijske siderofore (Goetz i sar., 2002). Zbog svoje odlike da ukaže na rane procese akutnog bubrežnog oštećenja, *LCN2* je danas najčešće izučavani biomarker ovog stanja (Huen i Parikh, 2015, Kuwabara i sar., 2009), te ne iznenađuje njena identifikacija i u ureterima sa CAKUT-om. Takođe, *LCN2* je opisan u animalnim modelima policističnih bubrega kao ključni efektor bubrežnog oštećenja i cistogeneze i kao marker progresije hronične bubrežne bolesti praćene tubularnom atrofijom, intersticijalnom fibrozom i infiltracijom inflamatornih ćelija (Viau i sar., 2010). Ove informacije sugerišu da detektovana povišena ekspresija *LCN2* u uzorku uretera pacijenata sa CAKUT-om signalizira na prisustvo inflamatornih i fibrotskih procesa, a takođe dodatno potvrđuje i jedinstvo patofizioloških mehanizama na nivou bubrega i urinarnog sistema.

Molekularna mreža 3 (Slika R5) je sadržala gene čija je funkcija povezana sa kancerom, povredama i abnormalnostima organizma i oboljenjima reproduktivnog sistema, što je ukazivalo na mehanizme koji mogu učestvovati i u nastanku CAKUT-a. Mreža je validirana proverom ekspresije gena *SOSTDC1* na nivou iRNK. Proteinski produkt ovog gena je bubržno specifični BMP antagonist koji moduliše

renoprotektivnu aktivnost BMP7 (Yanagita i sar., 2004). On takođe kontroliše i grananje ureterovog pupoljka za vreme razvića bubrega kao i postnatalnu otpornost na oštećenje (Tanaka i sar., 2008). Miševi nokauti za *SOSTDC1* (*SOSTDC1*^{-/-}) su rezistentni na povrede bubrega izazvane nefrotoksičnošću i unilateralnim opstrukcijama uretera (UUO), pa je inhibicija ekspresije *SOSTDC1* predložena za primenu u terapijske svrhe kod bubrežnih bolesti (Yanagita i sar., 2006). U ranijim studijama je dokumentovano da je ekspresija TGF- β 1, koji je važan razvojni faktor urinarnog sistema, povećana u stenotičnom tkivu kod pacijenata sa opstrukcijom na nivou UPJ u poređenju sa normalnim tkivom (Yang i sar., 2003), pa je i inhibicija TGF- β 1 predložena u terapiji fibroze bubrega da spreči EMT (Cho i sar., 2016). Analogno tome, postnatalna povišena ekspresija *SOSTDC1* u tkivu uretera može rezultovati izmenjenom BMP signalizacijom i patološkim promenama u urinarnom sistemu.

Molekularna mreža 5 (Slika R6) je sadržala gene čija je funkcija povezana sa ćelijskom morfologijom, funkcijom i održanjem ćelije i embrionalnim razvićem. Glavna karakteristika ove mreže na osnovu koje se razlikuje od ostalih analiziranih mreža je dominacija snižene ekspresije gena članova u CAKUT-u u odnosu na kontrole. Mreža je validirana proverom ekspresije gena *INA* na nivou iRNK. Produkt gena *INA* je član porodice neurofilamenata uključenih u morfogenezu neurona i transmisiju električnog impulsa duž aksona (Yuan i sar., 2012). U studiji u kojoj je kod opstrukcija i normalnih spojeva na nivou UPS vršeno bojenje tkiva uretera antitelima za proteine neurofilamenata je pokazano da su pozitivno obojeni neuralni elementi primetno redukovani u mišićnom sloju na nivou opstrukcija u poređenju sa kontrolama (Kajbafzadeh i sar., 2006). U uzorcima uretera koji su ispitivani u ovoj studiji, iako nisu svi sa opstruktivnom pozadinom, postojala je snižena ekspresija gena *INA*, sugerišući na taj način još jednom važnost inervacije uretera u patologiji CAKUT-a tj. važnost neuralne komponente i u razviću i u postnatalnim fiziološkim procesima urinarnog sistema.

Molekularna mreža 7 (Slika R7) je sadržala gene čija je funkcija povezana sa razvojnim poremećajem, poremećajem endokrinog sistema i urođenim poremećajem. Mreža je validirana proverom ekspresije gena *TAC3* na nivou iRNK.

Drugi gen iz grupe faktora odgovornih za normalnu aktivnost neurološke komponente urinarnog sistema (pored *INA*), čija je ekspresija validirana u *CAKUT*-u, pripada grupi tahikinina. Naime, *TAC3* je neurotransmiter i važan medijator kontrakcije mišićnih ćelija urinarnog trakta pacova (Maggi i sar., 1988). Samim tim, smanjenje ekspresije *TAC3* gena može potencijalno dovesti do abnormalnosti u protoku urina usled smanjene kontraktilnosti glatke muskulature urinarnog trakta, a samim tim i do funkcionalne opstrukcije. Pored toga što je pokazano da je *TAC3* aktivan na nivou urinarnog trakta, receptori za *TAC3* su takođe pronađeni i u bubrezima pacova, što pokazuje da poremećaj u ekspresiji ovog gena može takođe direktno da utiče i na fiziologiju bubrega (Chen i Hoover, 1995). Dosadašnja istraživanja aktivnosti tahikininskih peptida u svinjskim ureterima su pokazala da antagonisti tahikininskih receptora mogu biti kandidati za lečenje opstrukcija uretera (Jerde i sar., 1999). Za donošenje konačnog zaključka o ulozi *TAC3* ekspresije u *CAKUT*-u potrebne su dalje studije.

Uočena promena u ekspresiji validiranih gena u *CAKUT*-u u odnosu na kontrole čini ove gene važnim kandidatima za tkivne biomarkere ove bolesti. Buduće funkcionalne studije bi trebalo da rasvetle mehanizme odgovorne za nastanak uočenih promena u ekspresiji validiranih gena i ostalih članova ključnih molekularnih puteva. Kao prvi korak ka tom cilju, moraju se uzeti u obzir opisane molekularne mreže jer sadrže informacije o ključnim interakcijama iz određenog molekularnog puta, glavne (fokus) molekule i smer promene njihove ekspresije, kao i njihove uzvodne regulatore. Činjenica je da je kompleksnost mehanizama uključenih u patologiju *CAKUT*-a velika, što je i potvrđeno u ovoj studiji. Stoga u bliskoj budućnosti ostaje veliki izazov kako najbolje integrisati podatke dobijene iz ekspresione studije sa ostalim genetičkim, epigenetičkim i sredinskim mehanizmima i implementirati ih u personalizovane medicinske pristupe i preciznu terapiju. Takođe, bioinformatičko modelovanje bolesti na osnovu rezultata dobijenih korišćenjem tehnologija sa velikim protokom podataka poslužilo bi kao oruđe za pomoć u prognostičkom savetovanju.

5.2. Identifikacija aktivnosti miRNK na osnovu transkriptoma u CAKUT-u

5.2.1. Validacija CIA metode i unapređenje identifikacije ključnih miRNK potencijalno asociranih sa oboljenjem

Inovativna strategija koja obuhvata primenu multivarijacione statističke tehnike CIA u kombinaciji sa NSC i BGA analizama je pokazala veliki potencijal da integracijom podataka o genskoj ekspresiji sa GEČ-a i predikcije miRNK ciljnih gena iz više predikcionih algoritama identifikuje miRNK asocirane sa različitim stanjima ili oboljenjima (Madden i sar., 2010; Mulrane i sar., 2012; Jovanović i sar., 2014; Jovanović i sar., 2016). Međutim, ono što samu metodu čini još fleksibilnijom je to da kombinacija različitog broja i vrsta predikcionih algoritama može usmeriti analizu da identifikuje minimalni broj ključnih miRNK u ispitivanoj bolesti (Jovanović i sar., 2016). Budući da trenutno postoji mnoštvo različitih, međusobno komplementarnih algoritama koji predviđaju miRNK ciljna mesta, njihov odabir je važan za pravilnu analizu i interpretaciju rezultata. Važno je imati na umu da upotreba velikog broja različitih vrsta algoritama može dovesti do previđanja ključnih miRNK, jer sa većim brojem algoritama teže je postići konzistentnost između algoritama. Sa druge strane mali broj algoritama u analizi može rezultovati većim brojem lažno pozitivnih rezultata koji bi bili efekat same prirode predikcionog algoritma i prirode metode koja svaku promenu u ekspresiji gena pripisuje aktivnosti miRNK.

Iz opisanih razloga je izvršena validacija CIA metode upotrebom pet predikcionih algoritama po Madden-u i sar., 2010 (Jovanović i sar., 2014). Predikciona procedura algoritama korišćenih u validacionoj studiji se zasnivala na komplementarnosti *seed* regiona miRNK i 3'UTR iRNK, i konzerviranosti ciljnih mesta između vrsta. Primenom CIA metode na postojećem ekspresionom setu podataka GSE28829, sačinjenom od uzoraka sa dva fenotipa (segmenata karotidne arterije sa ranim ili uznapređovalim aterosklerotskim plakom), detektovane su miRNK potencijalno asocirane sa ova dva stadijuma ateroskleroze (Jovanović i sar., 2014). U vaskularnoj patologiji su, za razliku od CAKUT-a, miRNK dosta izučavane i informacije mogu poslužiti kao dobra validacija metode i odabira predikcionih

algoritama. Pretragom literature je utvrđeno da su miR-221, miR-222, miR-21, miR-127 i familija miR-146 opisane u procesima odgovornim za progresiju ateroskleroze (Nicoli i sar., 2012; Dentelli i sar., 2010; Ji i sar., 2007; Cipollone i sar., 2011; Sun i sar., 2011, Takahashi i sar., 2010). Sa druge strane, miR-100, miR-145, miR-155 i miR-24 su opisane u procesima protektivnim u kontekstu progresije plaka (Grundmann i sar., 2011; Cheng i sar., 2009; Cordes i sar., 2009; Zhu i sar., 2011; Li i sar., 2016; Wei i sar., 2013; Zhou i sar., 2011) što je takođe bilo u skladu sa našim rezultatima. Za ostalih 13 miRNK potencijalno asociranih sa ranim i 8 miRNK potencijalno asociranih sa uznapredovalim aterosklerotskim plakom je neophodna dalja eksperimentalna validacija.

Ovakva postavka predikcionih algoritama se pokazala kao pogodna za otkrivanje većeg broja miRNK koje su potencijalno u različitoj meri odgovorne za genski ekspresioni profil karakterističan za neko oboljenje. Međutim, budući da je koncept ove studije bio da se otkrije minimalni broj ključnih miRNK čija bi povišena ekspresija bila karakteristična za bolest i koje bi bile kandidati za eksperimentalnu validaciju, odlučeno je da je dodatno filtriranje rezultata neophodno. Integracija predikcija CoMeTa analize kao dodatnog predikcionog algoritma uvodi korekciju rezultata smanjenjem broja miRNK potencijalno asociranih sa oboljenjem. Na ovaj način je omogućeno uklanjanje frakcije miRNK asociranih sa karakterističnom ekspresijom gena koji su po koekspresionoj analizi loše rangirani ciljni geni (Jovanović i sar., 2016).

5.2.2. Identifikacija ključnih miRNK u CAKUT-u

Upotrebom CIA metode je izvršena integracija predikcije miRNK ciljnih gena i podataka o genskoj ekspresiji sa GEČ-a, i identifikovane su miRNK koje imaju potencijal da svojom aktivnošću izazovu uočene promene u genskoj ekspresiji karakteristične za CAKUT. Eksperimentalnom validacijom kompjuterski asociranih miRNK sa CAKUT-om potvrđena je ekspresija *mir-144*, *mir-375*, *mir-183* i *mir-200a* u tkivu uretera. Analizom eksperimentalnih rezultata uočen je statistički značajno povišen nivo miR-144 (5,7 puta) kod pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na kontrole. Iako razlika u ekspresiji kod ostalih validiranih miRNK nije bila

statistički značajna, sve su pokazivale trend u povišenju ekspresije u CAKUT-u u odnosu na kontrole, što je u skladu sa rezultatima CIA analize (Jovanović i sar., 2016).

5.2.3. Povećanje nivoa miR-144 u tkivu uretera pacijenata sa CAKUT-om u odnosu na tkivo uretera zdravih kontrola

Iako je predloženo da povišen nivo miR-144 u telesnim tečnostima može predstavljati biomarker dijabetesnog bubrežnog oštećenja (Yang i sar., 2013), uloga ove miRNK i biomarkerski potencijal nije ispitan u CAKUT-u. Gen za miR-144 je lokalizovan u polimorfnom regionu (17q11.2) bogatom varijabilnim brojem kopija (engl. *CNV – Copy Number Variation*) (MacDonald i sar., 2014). CNV su funkcionalne varijante koje mogu uticati na ekspresiju miRNK promenom broja miRNK gena kao i promenom pozicije regulatornih elemenata (Persengiev i sar., 2013). Rezultati studija koje su istraživale asocijaciju CNV sa CAKUT-om su pokazali da značajan broj pacijenata poseduje submikroskopske hromozomske disbalanse, između ostalog, i u regionu 17q11-12 (Sanna-Cherchi i sar., 2012, Caruana i Bertram, 2015). Iz opisanog je jasno da ekspresija *mir-144* može biti povišena kod specifičnih CNV genotipova. Udaljene interakcije između DNK segmenata sa prisutnim CNV mogu takođe direktno modifikovati ekspresioni profil miRNK (Persengiev i sar., 2013). Međutim, mehanizme odgovorne za regulaciju ekspresije miRNK ne treba interpretirati isključivo kroz genetičku varijabilnost zbog kompleksnog uticaja epigenetičkih interakcija i faktora sredine (Nicolaou i sar., 2015, Sato i sar., 2011). Naime, pokazano je da je ekspresija *mir-144* u inverznoj korelaciji sa metilacionim statusom celokupnog genoma u kanceru (Shen i sar., 2015). Epigenetičke modifikacije su takođe opisane i kao mehanizam koji omogućava interakciju između faktora sredine i genoma za vreme razvića, što može uticati i na promenu osetljivosti prema bolestima. Višegeneracijski efekti sredine su zabeleženi kod sisara u epidemiološkim studijama čoveka ili kod životinjskih modela kod glodara (Stapleton, 2016). Pošto su epigenetičke modifikacije reverzibilne i osetljive na stres iz spoljašnje sredine (npr. *in utero* stres), omogućavajući na taj način vremensku i razvojnu varijabilnost u genskoj

ekspresiji (Nicolaou i sar., 2015), ove modifikacije mogu uzrokovati promenu i u ekspresiji miRNK u ranom razviću, koja može ostati izmenjena čak i nakon rođenja.

Stabilno stanje nivoa miRNK u ćeliji je rezultat balansa između biogeneze miRNK, na koju mogu uticati CNV i epigenetički mehanizmi, i aktivne degradacije (Guo i sar., 2015). Međutim, razlika u kinetici degradacije između različitih izoformi iste miRNK kao i između različitih miRNK još uvek nije u potpunosti objašnjena (Guo i sar., 2015). Iz tog razloga, u budućim studijama bi trebalo obratiti pažnju, pored biogeneze, i na degradacione mehanizme.

Razviće bubrega i urinarnog trakta je kompleksan proces koji zahteva preciznu vremensku i prostornu modulaciju genske ekspresije, odgovornu za pravilnu proliferaciju, diferencijaciju i morfogenezu (Plisov i sar., 2000). Analizom grupa ciljnih gena miR-144 iz COOL analize kao i analizom GO rezultata dobijenih na tim grupama, otkriveno je da jedna grupa sadrži 511 ciljnih gena koji učestvuju u procesima relevantnim za CAKUT. Naime, određeni GO biološki procesi zastupljeni u grupi gena (razviće bubrega, razviće urogenitalnog sistema, razviće cevastih organa, embrionalno razviće organa) sugerišu da promena nivoa miR-144 može dovesti do poremećaja u razviću bubrega i urinarnog trakta.

Iako u studiji nivo miR-144, koja je asocirana sa razvojnim procesima, nije ispitivan u ljudskom tkivu za vreme razvića, već nakon rođenja, prethodne studije su pokazale da je identifikacija izmenjene aktivnosti razvojnih činilaca moguća i postnatalno. Naime, poznato je da određeni faktori, neophodni za kontrolu razvića mogu imati prolongiranu aktivnost i nakon rođenja u CAKUT-u. Na primer, TGF- β 1, jedan od glavnih faktora odgovornih za razviće bubrega, pokazuje povišen nivo iRNK u displastičnim epitelnim ćelijama i subsetu okolnih ćelija kod opstruktivnih bubrežnih displazija čoveka (Yang i sar., 2000). Povišeni nivo iRNK i proteina za TGF- β 1 je zabeležen i u stenotičnom tkivu uretera kod pacijenata sa opstrukcijom na nivou UPJ (Yang i sar., 2003). U poređenju sa displastičnim tkivom bubrega i stenotičnim tkivom uretera, ekspresija TGF- β 1 je kod normalnih organa bila negativna (Yang i sar., 2000; Yang i sar., 2003). Ovi podaci podržavaju mogućnost postojanja prolongirane aktivnosti određenih miRNK kao važnih epigenetičkih faktora u različitim fazama razvića urogenitalnog sistema. Poremećaj ekspresije tih

miRNK bi mogao dovesti do destabilizacije važnih signalnih puteva što bi moglo rezultovati razvojnim anomalijama.

5.3. Ograničenja studije

Jedno od ograničenja studije je isključeno bubrežno tkivo. Međutim, tkivo uretera je namerno odabrano zbog uniformnosti analiziranog tkiva i povećanja snage studije. Pošto je najčešća hirurška intervencija kod dece sa CAKUT-om korekcija urinarnog trakta, tkivo uretera je odabrano za ispitivanje u ovoj studiji. Tkivo uretera ima isto razvojno poreklo kao i sistem sabirnih kanalića bubrega, velike i male bubrežne čašice i bubrežne karlice (Bohnenpoll i Kispert, 2014). Takođe, epitel adultnog bubrega se sastoji od specijalizovanih ćelijskih linija od kojih neke potiču od epitelnih ćelija ureterovog pupoljka pri grananju (Plisov i sar., 2000). Iz tog razloga uočene promene u genskoj ekspresiji u uzorcima uretera poreklom od urinarnog sistema sa CAKUT-om mogu reflektovati veliki deo procesa koji na sličan način mogu uticati na različite delove ovog organskog sistema.

Jedno od glavnih ograničenja dela studije gde je ispitivana ekspresija miRNK u tkivu uretera je starosna razlika između pacijenata sa CAKUT-om i kontrola, jer je poznato da se ekspresija određenih miRNK menja sa starenjem (Persengiev i sar., 2011, Csiszar i sar., 2014, Mercken i sar., 2013). *mir-144* je opisana kao jedina miRNK koja sa starenjem pokazuje konzistentno povećanje ekspresije u malom mozgu ljudi i drugih primata kao i u kori velikog mozga kod primata (Persengiev i sar., 2011). Ekspresija *mir-144* je takođe povišena i u cerebromikrovaskularnim endotelnim ćelijama starih pacova (Csiszar i sar., 2014), kao i u skeletnim mišićima starih rezus majmuna (Mercken i sar., 2013) u poređenju sa mladim jedinkama tih vrsta. Iako ova visoko konzervirana miRNK pokazuje starosno-zavisno povećanje ekspresije, to ne utiče na zaključke ove studije jer je nivo miR-144 povišen u uzorcima uretera dece sa CAKUT-om u poređenju sa kontrolama koje su adulti. Ipak, od velike je važnosti da se u budućim studijama uradi validacija dobijenih rezultata na starosno uparenim uzorcima tkiva uretera.

Mogući razlog uočenog odstupanja između rezultata CIA i eksperimentalnih rezultata ekspresije *mir-183*, *mir-200a* i *mir-375* je primena predikcionih informacija u asocijaciji miRNK sa CAKUT-om. Međutim, podaci o eksperimentalno potvrđenim interakcijama između miRNK i iRNK su još uvek oskudni, pa predikcija još uvek predstavlja najsveobuhvatniji pristup. Iako je u studiji korišćen nov pristup za filtriranje miRNK asociраних sa bolešću pomoću CIA, rezultati zahtevaju dalju detaljnu eksperimentalnu validaciju. Takođe, razlika između platformi GEČ korišćenih u ovoj studiji i u CoMeTa predikcijama (Gennarino i sar., 2012) može rezultovati previđanjem određenih ciljnih gena od strane CIA, i na taj način uticati na asocijaciju miRNK sa CAKUT-om.

6. Zaključci

1. Utvrđeno je 78 diferencijalno eksprimiranih gena analizom ekspresije celokupnog genoma u tkivu uretera dece sa CAKUT-om u odnosu na zdrave kontrole.
2. Utvrđeno je da postoji visok nivo kompleksnosti bioloških procesa i molekularnih puteva koji su u CAKUT-u diferencijalno regulisani. Važne interakcije diferencijalno eksprimiranih gena u CAKUT-u se mogu predstaviti sa 7 mreža, od kojih 4 sadrže gene sa funkcijama koje se direktno mogu asociirati sa CAKUT-om. Ove mreže su ujedno i prikaz interakcija ključnih molekula u CAKUT-u i predstavljaju temelj budućih funkcionalnih studija.
3. Utvrđene su promene u nivoima iRNK za *LCN2*, *PROM1*, *SOSTDC1*, *RASD1*, *INA* i *TAC3* u tkivu uretera pacijenata u poređenju sa kontrolnim tkivom, koje mogu biti molekularni markeri za CAKUT. Validacijom najvažnijih molekularnih mreža u CAKUT-u utvrđen je značajno povišen nivo iRNK za *LCN2* (7,6 puta), *PROM1* (8 puta), i *SOSTDC1* (5,6 puta) i značajno snižen nivo iRNK za *RASD1* (4,5 puta), *INA* (3,3 puta) i *TAC3* (6,6 puta) u tkivu uretera dece sa CAKUT-om u odnosu na zdrave kontrole.
4. Metoda CIA bazirana na algoritmima za predikciju vezujućih mesta za miRNK zasnovanim na sekvenci je validirana na javno dostupnim podacima o ekspresiji celokupnog genoma i pokazala se uspešnom u identifikovanju većeg broja miRNK specifičnih za određeni fenotip.
5. Kombinacija metode CIA bazirane na pet algoritama za predikciju vezujućih mesta za miRNK zasnovanim na sekvenci i metode CIA bazirane na predikcijama vezujućih mesta za miRNK po algoritmu CoMeTa je validirana na podacima o ekspresiji celokupnog genoma u tkivu uretera dece sa CAKUT-om i zdravih kontrola i pokazala se uspešnom u identifikovanju specifičnih ključnih miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u CAKUT-u u odnosu na zdrave kontrole.

6. Utvrđeno je da miRNK sa potencijalno povišenom ekspresijom u CAKUT-u u odnosu na zdrave kontrole pripadaju manjem broju miRNK zajednica, koje dele značajan deo nizvodne regulatorne mreže sinergističkom regulacijom zajedničkih gena. Dakle, bolje rangirane miRNK u metodi CIA iz iste zajednice imaju veći potencijal da regulišu iste procese, koji mogu biti odgovorni za nastanak CAKUT-a.
7. U uzorcima tkiva uretera dece sa CAKUT-om i zdravih kontrola detektovana je i kvantifikovana ekspresija *mir-144*, *mir-200a*, *mir-183* i *mir-375*.
8. Utvrđeno je da postoji značajno povišen nivo miR-144 (5,7 puta) u tkivu uretera dece sa CAKUT-om u odnosu na zdrave kontrole. Rezultat ukazuje da povišeni nivo miR-144 u tkivu uretera pacijenata može biti molekularni marker za CAKUT.
9. Utvrđeno je da miR-144 potencijalno reguliše gene uključene u biološke procese odgovorne za normalno razviće urinarnog sistema.

7. Literatura

Arora A i Simpson DAC. Individual mRNA expression profiles reveal the effects of specific microRNAs. *Genome Biology*. 2008;9(5):R82-R82.

Arora A, McKay GJ i Simpson DA. Prediction and verification of miRNA expression in human and rat retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(9):3962-3967.

Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C i Roberts AB. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biology*. 1999;1(5):260-266.

Aufderheide E, Chiquet-Ehrismann R i Ekblom P. Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *The Journal of Cell Biology*. 1987;105(1):599-608.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998;392(6676):565-568.

Balikci O, Turunc T, Bal N, Celik H i Ozkardes H. Comparison of Cajal-like cells in pelvis and proximal ureter of kidney with and without hydronephrosis. *International Brazilian Journal Of Urology*. 2015;41(6):1178-1184.

Barnes MR. *Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data*, 2nd Edition. 2007.

Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S i Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:D991-995.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233.

Bartram M, Höhne M, Dafinger C, Völker L, Albersmeyer M, Heiss J, Göbel H, Brönneke H, Burst V, Liebau M, Benzing T, Schermer B i Müller RU. Conditional loss of kidney microRNAs results in congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Journal of Molecular Medicine*. 2013;91(6):739-748.

Bascands JL i Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney International*. 2005;68(3):925-937.

Baty F, Rudiger J, Miglino N, Kern L, Borger P i Brutsche M. Exploring the transcription factor activity in high-throughput gene expression data using RLQ analysis. *BMC Bioinformatics*. 2013;14(1):178.

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P i Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*. 2006;20(14):1885-1898.

Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(12):846-860.

Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C i Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biology*. 2010;11(8):R90.

Blake J i Rosenblum ND. Renal branching morphogenesis: morphogenetic and signaling mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;36:2-12.

Bohnenpoll T i Kispert A. Ureter growth and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014;36:21-30.

Bohnsack MT, Czaplinski K i Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-191.

Boor P, Ostendorf T i Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nature Reviews Nephrology*. 2010;6(11):643-656.

Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubüser A i Busslinger M. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes & Development*. 2002;16(22):2958-2970.

Brennecke J, Stark A, Russell RB i Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*. 2005;3(3):e85.

Brunskill EW, Aronow BJ, Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Aronow J, Kaimal V, Jegga AG, Yu J, Grimmond S, McMahon AP, Patterson LT, Little MH i Potter SS. Atlas of gene expression in the developing kidney at microanatomic resolution. *Developmental Cell*. 2008;15(5):781-791.

Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS i Wilson VA. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes & Development*. 1998;12(12):1894-1906.

Burnstock, G. Structure of smooth muscle and its innervation. In: *Smooth Muscle*. Edited by E. Bulbring, A.F. Brading, A.W. Jones and T. Tomita. Baltimore: Williams and Wilkins Co., pp. 1-69, 1970.

Burton C i Harris KP. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*. 1996;27(6):765-775.

^bZhu N, Zhang D, Chen S, Liu X, Lin L, Huang X, Guo Z, Liu J, Wang Y, Yuan W i Qin Y. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):286-293.

Cacalano G, Farinas I, Wang LC, Hagler K, Forgie A, Moore M, Armanini M, Phillips H, Ryan AM, Reichardt LF, Hynes M, Davies A i Rosenthal A. GFR α 1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron*. 1998;21(1):53-62.

Cai X, Hagedorn CH i Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-1966.

Canda AE, Turna B, Cinar GM i Nazli O. Physiology and pharmacology of the human ureter: basis for current and future treatments. *Urologia Internationalis*. 2007;78(4):289-298.

Cao Z, Kelly DJ, Cox A, Casley D, Forbes JM, Martinello P, Dean R, Gilbert RE i Cooper ME. Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney International*. 2000;58(6):2437-2451.

Carlson B. *Human Embryology and Developmental Biology E-Book*, 5th Edition. 2013.

Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A i McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental Cell*. 2005;9(2):283-292.

Carthew RW i Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-655.

Caruana G i Bertram JF. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract genetics in mice and men. *Nephrology (Carlton, Vic.)*. 2015;20(5):309-311.

Chan HM, Zhu LF, Zhong R, Grant D, Goyer RA i Cherian MG. Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1993;123(1):89-96.

Chen Y i Hoover DB. Autoradiographic localization of NK1 and NK3 tachykinin receptors in rat kidney. *Peptides*. 1995;16(4):673-681.

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE i Shiekhattar R. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 2007;447(7146):823-828.

Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP i Kopan R. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* (Cambridge, England). 2007;134(4):801-811.

Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES i Zhang C. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research*. 2009;105(2):158-166.

Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Belloch R, Schroth GP, Nusbaum C i Bartel DP. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & Development*. 2010;24(10):992-1009.

Cho JH, Ryu HM, Oh EJ, Yook JM, Ahn JS, Jung HY, Choi JY, Park SH, Kim YL, Kwak IS i Kim CD. Alpha1-Antitrypsin Attenuates Renal Fibrosis by Inhibiting TGF-beta1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition. *PloS One*. 2016;11(9):e0162186.

Choi YJ, Baranowska-Daca E, Nguyen V, Koji T, Ballantyne CM, Sheikh-Hamad D, Suki WN i Truong LD. Mechanism of chronic obstructive uropathy: increased expression of apoptosis-promoting molecules. *Kidney International*. 2000;58(4):1481-1491.

Choi YJ, Mendoza L, Rha SJ, Sheikh-Hamad D, Baranowska-Daca E, Nguyen V, Smith CW, Nassar G, Suki WN i Truong LD. Role of p53-dependent activation of caspases in chronic obstructive uropathy: evidence from p53 null mutant mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(5):983-992.

Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, Uchino S, Spigonardo F, Mandolini C, Malatesta S, Bucci M, Mammarella C, Santovito D, de Lutiis F, Marchetti A, Mezzetti A i Buttitta F. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*. 2011;42(9):2556-2563.

Cole RS, Fry CH i Shuttleworth KE. The action of the prostaglandins on isolated human ureteric smooth muscle. *British Journal of Urology*. 1988;61(1):19-26.

Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN i Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460(7256):705-710.

Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation*. 2006;74(7):402-421.

Csiszar A, Gautam T, Sosnowska D, Tarantini S, Banki E, Tucsek Z, Toth P, Losonczy G, Koller A, Reglodi D, Giles CB, Wren JD, Sonntag WE i Ungvari Z. Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2014;307(3):H292-306.

Culhane AC, Thioulouse J, Perriere G i Higgins DG. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics*. 2005;21(11):2789-2790.

D'Haeseleer P. How does gene expression clustering work? *Nature Biotechnology*. 2005;23(12):1499-1501.

Davies J, Lyon M, Gallagher J i Garrod D. Sulphated proteoglycan is required for collecting duct growth and branching but not nephron formation during kidney development. *Development*. 1995;121(5):1507-1517.

Demirbilek S, Edali MN, Gurunluoglu K, Turkmen E, Tas E, Karaman A, Akin M, Aksoy RT, Celbis O i Uzun I. Glial cell line-derived neurotrophic factor and synaptophysin expression in pelviureteral junction obstruction. *Urology*. 2006;67(2):400-405.

Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D i Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30(8):1562-1568.

Diederichs S i Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 2007;131(6):1097-1108.

Djuric T, Zivkovic M, Milosevic B, Andjelevski M, Cvetkovic M, Kostic M i Stankovic A. MMP-1 and -3 haplotype is associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatric Nephrology*. 2014;29(5):879-884.

Doray B, Gasser B, Reinartz I i Stoll C. Hereditary renal adysplasia in a three generations family. *Genetic Counseling*. 1999;10(3):251-257.

Doring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RT, Soehnlein O, Busch M, Manca M, Koenen RR, Pelisek J, Daemen MJ, Lutgens E, Zenke M, Binder CJ, Weber C i Zernecke A. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation*. 2012;125(13):1673-1683.

dos Santos Junior AC, de Miranda DM i Simoes e Silva AC. Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: an embryogenetic review. *Birth Defects Research*. 2014;102(4):374-381.

Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development*. 2009;136(23):3863-3874.

Du P, Kibbe WA i Lin SM. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*. 2008;24(13):1547-1548.

Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1996;7(12):2495-2508.

Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C i Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biology*. 2003;5(1):R1.

Esteban V, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J i Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15(6):1514-1529.

Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M i Izaurralde E. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes & Development*. 2007;21(20):2558-2570.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY i Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(4):890-898.

Fang M, Jaffrey SR, Sawa A, Ye K, Luo X i Snyder SH. Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON. *Neuron*. 2000;28(1):183-193.

Friberg L. Cadmium and the kidney. *Environmental Health Perspectives*. 1984;54:1-11.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB i Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009;19(1):92-105.

Fujiwara T i Yada T. miRNA-target prediction based on transcriptional regulation. *BMC Genomics*. 2013;14(Suppl 2):S3.

Gao X, Chen X, Taglienti M, Rumballe B, Little MH i Kreidberg JA. Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by Wt1 and Vegfa. *Development*. 2005;132(24):5437-5449.

Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A i Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011;18(10):1139-1146.

Gennarino VA, D'Angelo G, Dharmalingam G, Fernandez S, Russolillo G, Sanges R, Mutarelli M, Belcastro V, Ballabio A, Verde P, Sardiello M i Banfi S. Identification of microRNA-regulated gene networks by expression analysis of target genes. *Genome Research*. 2012;22(6):1163-1172.

Ghildiyal M i Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(2):94-108.

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ i Schier AF. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*. 2006;312(5770):75-79.

Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN i Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell*. 2002;10(5):1033-1043.

Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, Nakagawa N, Xin C, Newitt R, Pandya S, Xia TH, Liu X, Borza DB, Grafals M, Shankland SJ, Himmelfarb J, Portilla D, Liu S, Chau BN i Duffield JS. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(1):141-156.

Grieshammer U, Cebrian C, Ilagan R, Meyers E, Herzlinger D i Martin GR. FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons. *Development*. 2005;132(17):3847-3857.

Grieshammer U, Le M, Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M i Martin GR. SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Developmental Cell*. 2004;6(5):709-717.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S i Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(suppl 1):D154-D158.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP i Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*. 2007;27(1):91-105.

Groothoff JW. Long-term outcomes of children with end-stage renal disease. *Pediatric Nephrology*. 2005;20(7):849-853.

Grote D, Boualia SK, Souabni A, Merkel C, Chi X, Costantini F, Carroll T i Bouchard M. Gata3 acts downstream of beta-catenin signaling to prevent ectopic metanephric kidney induction. *PLoS Genetics*. 2008;4(12):e1000316.

Grote D, Souabni A, Busslinger M i Bouchard M. Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Development*. 2006;133(1):53-61.

Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, Sluijter JP, Hofer I, Pasterkamp G, Bode C i Moser M. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2011;123(9):999-1009.

Gunduz M, Yurtcu M, Toy H, Abasiyanik A i Demirci S. Immunohistochemical and morphometric evaluation of neuronal dysfunction in pelviureteral junction obstruction. *Journal of Pediatric Urology*. 2013;9(3):359-363.

Guo H, Ingolia NT, Weissman JS i Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-840.

Guo Y, Liu J, Elfenbein SJ, Ma Y, Zhong M, Qiu C, Ding Y i Lu J. Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(4):2326-2341.

Ha M i Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(8):509-524.

Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ i Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatric Nephrology*. 2012;27(3):363-373.

Harish J, Joshi K, Rao KL, Narasimhan KL, Samujh R, Choudhary SK i Mahajan JK. Pelviureteric junction obstruction: how much is the extent of the upper ureter with defective innervation needing resection? *Journal Of Pediatric Surgery*. 2003;38(8):1194-1198.

Hartwig S, Ho J, Pandey P, Macisaac K, Taglienti M, Xiang M, Alterovitz G, Ramoni M, Fraenkel E i Kreidberg JA. Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development*. 2010;137(7):1189-1203.

Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Fried C, Tanzer A, Flamm C, Hofacker IL i Stadler PF. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. *BMC Genomics*. 2006;7:25.

Ho J, Ng KH, Rosen S, Dostal A, Gregory RI i Kreidberg JA. Podocyte-Specific Loss of Functional MicroRNAs Leads to Rapid Glomerular and Tubular Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(11):2069-2075.

Ho J, Pandey P, Schatton T, Sims-Lucas S, Khalid M, Frank MH, Hartwig S i Kreidberg JA. The pro-apoptotic protein Bim is a microRNA target in kidney progenitors. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(6):1053-1063.

Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA i Wells TN. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. 1997;36(44):13570-13578.

Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y i Bell GI. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature Genetics*. 1997;17(4):384-385.

^aHuang da W, Sherman BT i Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(1):1-13.

^bHuang da W, Sherman BT i Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 2009;4(1):44-57.

Huen SC i Parikh CR. Molecular phenotyping of clinical AKI with novel urinary biomarkers. *American journal of physiology. Renal Physiology*. 2015;309(5):F406-413.

Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK i Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(47):16961-16966.

Huntzinger E i Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):99-110.

Hutvagner G i Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297(5589):2056-2060.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T i Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-838.

Hwang DY, Dworschak GC, Kohl S, Saisawat P, Vivante A, Hilger AC, Reutter HM, Soliman NA, Bogdanovic R, Kehinde EO, Tasic V i Hildebrandt F. Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Kidney International*. 2014;85(6):1429-1433.

Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H i Nakao A. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2004;66(2):597-604.

Jacobson MD, Weil M i Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997;88(3):347-354.

James MT, Hemmelgarn BR i Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet*. 2010;375(9722):1296-1309.

Jerde TJ, Saban R, Bjorling DE i Nakada SY. NK-2 is the predominant tachykinin receptor subtype in the swine ureter. *BJU International*. 1999;83(3):312-318.

Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB i Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research*. 2007;100(11):1579-1588.

Johnston JH, Evans JP, Glassberg KI i Shapiro SR. Pelvic hydronephrosis in children: a review of 219 personal cases. *The Journal of Urology*. 1977;117(1):97-101.

Jovanovic I, Zivkovic M, Jovanovic J, Djuric T i Stankovic A. The co-inertia approach in identification of specific microRNA in early and advanced atherosclerosis plaque. *Medical hypotheses*. 2014;83(1):11-15.

Jovanovic I, Zivkovic M, Kostic M, Krstic Z, Djuric T, Kolic I, Alavantic D i Stankovic A. 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*. 2016;14(1):193.

Kajbafzadeh AM, Payabvash S, Salmasi AH, Monajemzadeh M i Tavangar SM. Smooth muscle cell apoptosis and defective neural development in congenital ureteropelvic junction obstruction. *The Journal of Urology*. 2006;176(2):718-723.

Kaplan BS, Milner LS, Jequier S, Kaplan P i de Chadarevian JP. Autosomal dominant inheritance of small kidneys. *American Journal of Medical Genetics*. 1989;32(1):120-126.

Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana E, Zhao J, Shimer E, Dysart S, Chen X, Bader AG i Slack FJ. A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2015;34(27):3547-3555.

Kauffmann A, Gentleman R i Huber W. arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*. 2009;25(3):415-416.

Kawamata T, Seitz H i Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2009;16(9):953-960.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ i Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*. 2001;15(20):2654-2659.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(5):376-385.

Kim WJ, Yun SJ, Lee TS, Kim CW, Lee HM i Choi H. Collagen-to-smooth muscle ratio helps prediction of prognosis after pyeloplasty. *The Journal of Urology*. 2000;163(4):1271-1275.

Klaassen CD, Liu J i Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1999;39:267-294.

Klahr S, Schreiner G i Ichikawa I. The Progression of Renal Disease. *New England Journal of Medicine*. 1988;318(25):1657-1666.

Klahr S i Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *American journal of physiology - Renal Physiology*. 2002;283(5):F861-875.

^aKnerr I, Dittrich K, Miller J, Kummer W, Rosch W, Weidner W i Rascher W. Alteration of neuronal and endothelial nitric oxide synthase and neuropeptide Y in congenital ureteropelvic junction obstruction. *Urological Research*. 2001;29(2):134-140.

^bKnerr I, Nyul Z, Miller J, Rosch W, Dotsch J, Repp R, Weidner W i Rascher W. Increased endothelin-1 and decreased adrenomedullin gene expression in the stenotic tissue of congenital pelvi-ureteric junction obstruction in children. *BJU International*. 2001;87(7):667-671.

Kobayashi A i Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews - Genetics*. 2003;4(12):969-980.

Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL i Behringer RR. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development*. 2005;132(12):2809-2823.

Kohl S, Hwang DY, Dworschak GC, Hilger AC, Saisawat P, Vivante A, Stajic N, Bogdanovic R, Reutter HM, Kehinde EO, Tasic V i Hildebrandt F. Mild recessive mutations in six Fraser syndrome-related genes cause isolated congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(9):1917-1922.

Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U i Engel W. Mutations in the *SALL1* putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nature Genetics*. 1998;18(1):81-83.

Koleda P, Apoznanski W, Wozniak Z, Rusiecki L, Szydelko T, Pilecki W, Polok M, Kalka D i Pupka A. Changes in interstitial cell of Cajal-like cells density in congenital ureteropelvic junction obstruction. *International Urology and Nephrology*. 2012;44(1):7-12.

Kozomara A i Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:D68-73.

Kozomara A i Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(suppl 1):D152-D157.

Krediet RT i Balafa O. Cardiovascular risk in the peritoneal dialysis patient. *Nature Reviews Nephrology*. 2010;6(8):451-460.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M i Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. 2005;37(5):495-500.

Krol J, Loedige I i Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*. 2010;11(9):597-610.

Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J i Nakao K. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney International*. 2009;75(3):285-294.

Lee RC, Feinbaum RL i Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S i Kim VN. The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S i Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*. 2002;21(17):4663-4670.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH i Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 2004;23(20):4051-4060.

Leierer J, Rudnicki M, Braniff S-J, Perco P, Koppelstaetter C, Mühlberger I, Eder S, Kerschbaum J, Schwarzer C, Schroll A, Weiss G, Schneeberger S, Wagner S, Königsrainer A, Böhmig GA i Mayer G. Metallothioneins and renal ageing. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2016;31(9):1444-1452.

Lelongt B, Makino H, Dalecki TM i Kanwar YS. Role of proteoglycans in renal development. *Developmental Biology*. 1988;128(2):256-276.

Lemos CC, Tovar AM, Guimaraes MA i Bregman R. Effect of castration on renal glycosaminoglycans and their urinary excretion in male and female rats with

chronic renal failure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013;46(7):567-573.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP i Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-798.

Li X, Kong D, Chen H, Liu S, Hu H, Wu T, Wang J, Chen W, Ning Y, Li Y i Lu Z. miR-155 acts as an anti-inflammatory factor in atherosclerosis-associated foam cell formation by repressing calcium-regulated heat stable protein 1. *Scientific Reports*. 2016;6:21789.

Lijnen P i Petrov V. Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002;24(6):333-344.

Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB i Bartel DP. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*. 2003;17(8):991-1008.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L i Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004;305(5689):1437-1441.

Liu J, Liu Y, Habeebu SS i Klaassen CD. Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicological Sciences*. 1998;46(1):197-203.

Loane M, Dolk H, Kelly A, Teljeur C, Greenlees R i Densem J. Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*. 2011;91 Suppl 1:S31-43.

Long D, Lee R, Williams P, Chan CY, Ambros V i Ding Y. Potent effect of target structure on microRNA function. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007;14(4):287-294.

Lortat-Jacob H, Grosdidier A i Imberty A. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(3):1229-1234.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE i Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-98.

Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A i Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes & Development*. 1995;9(22):2808-2820.

MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L i Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:D986-992.

Madariaga L, Moriniere V, Jeanpierre C, Bouvier R, Loget P, Martinovic J, Dechelotte P, Leporrier N, Thauvin-Robinet C, Jensen UB, Gaillard D, Mathieu M, Turlin B, Attie-Bitach T, Salomon R, Gubler MC, Antignac C i Heidet L. Severe prenatal renal anomalies associated with mutations in HNF1B or PAX2 genes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2013;8(7):1179-1187.

Madden S, Carpenter S, Jeffery I, Bjorkbacka H, Fitzgerald K, O'Neill L i Higgins D. Detecting microRNA activity from gene expression data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):257.

Maggi CA, Parlani M, Astolfi M, Santicioli P, Rovero P, Abelli L, Somma V, Giuliani S, Regoli D, Patacchini R i Meli A. Neurokinin receptors in the rat lower urinary tract. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1988;246(1):308-315.

Majumdar A, Vainio S, Kispert A, McMahon J i McMahon AP. Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development*. 2003;130(14):3175-3185.

Marrone AK i Ho J. MicroRNAs: potential regulators of renal development genes that contribute to CAKUT. *Pediatric nephrology* (Berlin, Germany). 2014;29(4):565-574.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF i Sonenberg N. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 2007;317(5845):1764-1767.

McMahon AP, Aronow BJ, Davidson DR, Davies JA, Gaido KW, Grimmond S, Lessard JL, Little MH, Potter SS, Wilder EL i Zhang P. GUDMAP: the genitourinary developmental molecular anatomy project. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(4):667-671.

McPherson E, Carey J, Kramer A, Hall JG, Pauli RM, Schimke RN i Tasin MH. Dominantly inherited renal adysplasia. *American Journal of Medical Genetics*. 1987;26(4):863-872.

Mendelsohn C. Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development. *Organogenesis*. 2009;5(1):306-314.

Mercken EM, Majounie E, Ding J, Guo R, Kim J, Bernier M, Mattison J, Cookson MR, Gorospe M, de Cabo R i Abdelmohsen K. Age-associated miRNA alterations in skeletal muscle from rhesus monkeys reversed by caloric restriction. *Aging*. 2013;5(9):692-703.

Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE i Dietz HG. Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *The Journal of Urology*. 2004;172(2):769-772.

Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED i Felsen D. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney International*. 2000;58(6):2301-2313.

Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I i Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*. 1997;124(9):1653-1664.

Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H i Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes & Development*. 2005;19(23):2837-2848.

Monn E i Nordshus T. Hereditary renal adysplasia. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1984;73(2):278-280.

Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y i Davidson BL. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*. 2010;16(3):495-505.

Morrissey JJ i Klahr S. Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *The American Journal of Physiology*. 1999;276(1 Pt 2):F39-45.

Mulrane L, Madden SF, Brennan DJ, Gremel G, McGee SF, McNally S, Martin F, Crown JP, Jirstrom K, Higgins DG, Gallagher WM i O'Connor DP. miR-187 is an independent prognostic factor in breast cancer and confers increased invasive potential in vitro. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(24):6702-6713.

Murakami M, Tomiyama Y, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Park YC, Ohnishi N, Sugiyama T i Kurita T. Effects of beta-adrenergic stimulation on the acutely obstructed ureter in dogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;292(1):67-75.

Murakumo M, Nonomura K, Yamashita T, Ushiki T, Abe K i Koyanagi T. Structural changes of collagen components and diminution of nerves in congenital ureteropelvic junction obstruction. *The Journal of Urology*. 1997;157(5):1963-1968.

Nagalakshmi VK, Ren Q, Pugh MM, Valerius MT, McMahon AP i Yu J. Dicer regulates the development of nephrogenic and ureteric compartments in the mammalian kidney. *Kidney International*. 2011;79(3):317-330.

^aNicolaou N, Pulit SL, Nijman IJ, Monroe GR, Feitz WF, Schreuder MF, van Eerde AM, de Jong TP, Giltay JC, van der Zwaag B, Havenith MR, Zwakenberg S, van der Zanden LF, Poelmans G, Cornelissen EA, Lilien MR, Franke B, Roeleveld N, van Rooij IA, Cuppen E, Bongers EM, Giles RH, Knoers NV i Renkema KY. Prioritization and burden analysis of rare variants in 208 candidate genes suggest they do not play a major role in CAKUT. *Kidney International*. 2016;89(2):476-486.

^bNicolaou N, Renkema KY, Bongers EM, Giles RH i Knoers NV. Genetic, environmental, and epigenetic factors involved in CAKUT. *Nature Reviews Nephrology*. 2015;11(12):720-731.

Nicoli S, Knyphausen CP, Zhu LJ, Lakshmanan A i Lawson ND. miR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development. *Developmental Cell*. 2012;22(2):418-429.

Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, Yoshida H, Ichiki T, Threadgill D, Phillips JA, 3rd, Hogan BM, Fogo A, Brock JW, 3rd, Inagami T i Ichikawa I. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Molecular Cell*. 1999;3(1):1-10.

Nottrott S, Simard MJ i Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2006;13(12):1108-1114.

Nyengaard JR i Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *The Anatomical Record*. 1992;232(2):194-201.

Ohler U, Yekta S, Lim LP, Bartel DP i Burge CB. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA*. 2004;10(9):1309-1322.

Olsen PH i Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*. 1999;216(2):671-680.

Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS i Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & Development*. 2008;22(22):3172-3183.

Patel V, Hajarnis S, Williams D, Hunter R, Huynh D i Igarashi P. MicroRNAs regulate renal tubule maturation through modulation of Pkd1. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;23(12):1941-1948.

Persengiev S, Kondova I i Bontrop R. Insights on the functional interactions between miRNAs and copy number variations in the aging brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2013;6:32.

Persengiev S, Kondova I, Otting N, Koeppen AH i Bontrop RE. Genome-wide analysis of miRNA expression reveals a potential role for miR-144 in brain aging and spinocerebellar ataxia pathogenesis. *Neurobiology of Aging*. 2011;32(12):2316.e2317-2327.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E i Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573-1576.

Pio G, Malerba D, D'Elia D i Ceci M. Integrating microRNA target predictions for the discovery of gene regulatory networks: a semi-supervised ensemble learning approach. *BMC Bioinformatics*. 2014;15(Suppl 1):S4.

Plisov SY, Ivanov SV, Yoshino K, Dove LF, Plisova TM, Higinbotham KG, Karavanova I, Lerman M i Perantoni AO. Mesenchymal-epithelial transition in the developing metanephric kidney: gene expression study by differential display. *Genesis*. 2000;27(1):22-31.

Pope Jc, Brock JW, 3rd, Adams MC, Stephens FD i Ichikawa I. 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*. 1999;10(9):2018-2028.

Potter E. Normal and abnormal development of the kidney. Year Book Medical Publishers. 1972.

Price KL, Long DA, Jina N, Liapis H, Hubank M, Woolf AS i Winyard PJD. Microarray interrogation of human metanephric mesenchymal cells highlights potentially important molecules in vivo. *Physiological Genomics*. 2007;28(2):193-202.

Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN i Kosco-Vilbois MH. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):1885-1890.

Prozialeck WC i Edwards JR. Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *Biometals*. 2010;23(5):793-809.

Raats CJ, Van Den Born J i Berden JH. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney International*. 2000;57(2):385-400.

Rani A, Kumar A, Lal A i Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research*. 2014;24(4):378-399.

Reidy KJ i Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Seminars in Nephrology*. 2009;29(4):321-337.

Renkema KY, Stokman MF, Giles RH i Knoers NV. Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2014;10(8):433-444.

Renkema KY, Winyard PJ, Skovorodkin IN, Levtchenko E, Hindryckx A, Jeanpierre C, Weber S, Salomon R, Antignac C, Vainio S, Schedl A, Schaefer F, Knoers NV i Bongers EM. Novel perspectives for investigating congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT). *Nephrology, dialysis, transplantation*. 2011;26(12):3843-3851.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W and Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(7):e47.

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S i Egidio J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney International*. 2002;(82):S12-22.

Rumballe B, Georgas K, Wilkinson L i Little M. Molecular anatomy of the kidney: what have we learned from gene expression and functional genomics? *Pediatric Nephrology*. 2010;25(6):1005-1016.

Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S i Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(9):2443-2456.

Saisawat P, Tasic V, Vega-Warner V, Kehinde EO, Gunther B, Airik R, Innis JW, Hoskins BE, Hoefele J, Otto EA i Hildebrandt F. Identification of two novel CAKUT-causing genes by massively parallel exon resequencing of candidate genes in patients with unilateral renal agenesis. *Kidney International*. 2012;81(2):196-200.

Saldanha AJ. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3246-3248.

Salzano S, Checconi P, Hanschmann E-M, Lillig CH, Bowler LD, Chan P, Vaudry D, Mengozzi M, Coppo L, Sacre S, Atkuri KR, Sahaf B, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Mullen L i Ghezzi P. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(33):12157-12162.

Sanna-Cherchi S, Kiryluk K, Burgess KE, Bodria M, Sampson MG, Hadley D, Nees SN, Verbitsky M, Perry BJ, Sterken R, Lozanovski VJ, Materna-Kiryluk A, Barlassina C, Kini A, Corbani V, Carrea A, Somenzi D, Murtas C, Ristoska-Bojkovska N, Izzi C, Bianco B, Zaniew M, Flogelova H, Weng PL, Kacak N, Giberti S, Gigante M, Arapovic A, Drnasin K, Caridi G, Curioni S, Allegri F, Ammenti A, Ferretti S, Goj V, Bernardo L, Jobanputra V, Chung WK, Lifton RP, Sanders S, State M, Clark LN, Saraga M, Padmanabhan S, Dominiczak AF, Foroud T, Gesualdo L, Gucev Z, Allegri L, Latos-Bielenska A, Cusi D, Scolari F, Tasic V, Hakonarson H, Ghiggeri GM i Gharavi AG. Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations. *American Journal of Human Genetics*. 2012;91(6):987-997.

Sanna-Cherchi S, Sampogna RV, Papeta N, Burgess KE, Nees SN, Perry BJ, Choi M, Bodria M, Liu Y, Weng PL, Lozanovski VJ, Verbitsky M, Lugani F, Sterken R, Paragas N, Caridi G, Carrea A, Dagnino M, Materna-Kiryluk A, Santamaria G, Murtas C, Ristoska-Bojkovska N, Izzi C, Kacak N, Bianco B, Giberti S, Gigante M, Piaggio G, Gesualdo L, Kosuljandic Vukic D, Vukojevic K, Saraga-Babic M, Saraga M, Gucev Z, Allegri L, Latos-Bielenska A, Casu D, State M, Scolari F, Ravazzolo R, Kiryluk K, Al-Awqati Q, D'Agati VD, Drummond IA, Tasic V, Lifton RP, Ghiggeri GM i Gharavi AG. Mutations in *DSTYK* and dominant urinary tract malformations. *The New England Journal of Medicine*. 2013;369(7):621-629.

Santis WF, Peters CA, Yalla SV i Sullivan MP. Ureteral function is modulated by a local renin-angiotensin system. *The Journal of Urology*. 2003;170(1):259-263.

Santis WF, Sullivan MP, Gobet R, Cisek LJ, McGoldrick RJ, Yalla SV i Peters CA. Characterization of ureteral dysfunction in an experimental model of congenital bladder outlet obstruction. *The Journal of Urology*. 2000;163(3):980-984.

Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB i Eccles MR. Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nature Genetics*. 1995;9(4):358-364.

Sariola H, Ekblom P i Henke-Fahle S. Embryonic neurons as in vitro inducers of differentiation of nephrogenic mesenchyme. *Developmental Biology*. 1989;132(2):271-281.

Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ i Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *The FEBS Journal*. 2011;278(10):1598-1609.

Saxen L. Organogenesis of the Kidney. Cambridge University Press. 1987.

Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(10):791-802.

Schmittgen TD i Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1101-1108.

Schwartz JD, Dumler F, Hafron JM, Wilson GD, Wolforth SC, Rooney MT, Li W i Zhang PL. CD133 Staining Detects Acute Kidney Injury and Differentiates Clear Cell Papillary Renal Cell Carcinoma from Other Renal Tumors. *ISRN Biomarkers*. 2013;2013:8.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N i Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.

Sequeira-Lopez ML, Weatherford ET, Borges GR, Monteagudo MC, Pentz ES, Harfe BD, Carretero O, Sigmund CD i Gomez RA. The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxtaglomerular cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(3):460-467.

Shakya R, Watanabe T i Costantini F. The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis. *Developmental Cell*. 2005;8(1):65-74.

Shen J, Wang S, Siegel AB, Remotti H, Wang Q, Sirosh I i Santella RM. Genome-Wide Expression of MicroRNAs Is Regulated by DNA Methylation in Hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology Research and Practice*. 2015;2015:230642.

Shirdel EA, Xie W, Mak TW i Jurisica I. NAViGaTing the Micronome – Using Multiple MicroRNA Prediction Databases to Identify Signalling Pathway-Associated MicroRNAs. *PloS One*. 2011;6(2):e17429.

Shokeir AA i Nijman RJM. Primary megaureter: current trends in diagnosis and treatment. *BJU International*. 2000;86(7):861-868.

Simoese e Silva AC, Valerio FC, Vasconcelos MA, Miranda DM i Oliveira EA. Interactions between cytokines, congenital anomalies of kidney and urinary tract and chronic kidney disease. *Clinical & Developmental Immunology*. 2013;2013:597920.

Slonim DK i Yanai I. Getting Started in Gene Expression Microarray Analysis. *PLOS Computational Biology*. 2009;5(10):e1000543.

Song R i Yosypiv IV. Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Pediatric Nephrology*. 2011;26(3):353-364.

Stankovic A, Zivkovic M, Kostic M, Atanackovic J, Krstic Z i Alavantic D. Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT. *Clinical Biochemistry*. 2010;43(1-2):71-75.

Stapleton PA. Gestational nanomaterial exposures: microvascular implications during pregnancy, fetal development and adulthood. *The Journal of Physiology*. 2016;594(8):2161-2173.

Steer DL, Shah MM, Bush KT, Stuart RO, Sampogna RV, Meyer TN, Schwesinger C, Bai X, Esko JD i Nigam SK. Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulfated proteoglycans in the developing kidney. *Developmental Biology*. 2004;272(2):310-327.

Stewart K i Bouchard M. Kidney and urinary tract development: an apoptotic balancing act. *Pediatric Nephrology*. 2011;26(9):1419-1425.

Stoll C, Dott B, Alembik Y i Roth MP. Associated malformations among infants with neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics*. 2011;155a(3):565-568.

Sun SG, Zheng B, Han M, Fang XM, Li HX, Miao SB, Su M, Han Y, Shi HJ i Wen JK. miR-146a and Kruppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Reports*. 2011;12(1):56-62.

Takahashi Y, Satoh M, Minami Y, Tabuchi T, Itoh T i Nakamura M. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. *Clinical Science*. 2010;119(9):395-405.

Tanaka M, Endo S, Okuda T, Economides AN, Valenzuela DM, Murphy AJ, Robertson E, Sakurai T, Fukatsu A, Yancopoulos GD, Kita T i Yanagita M. Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury. *Kidney International*. 2008;73(2):181-191.

Thomas R, Sanna-Cherchi S, Warady BA, Furth SL, Kaskel FJ i Gharavi AG. HNF1B and PAX2 mutations are a common cause of renal hypodysplasia in the CKiD cohort. *Pediatric Nephrology*. 2011;26(6):897-903.

Tripathi P, Guo Q, Wang Y, Coussens M, Liapis H, Jain S, Kuehn MR, Capecchi MR i Chen F. Midline signaling regulates kidney positioning but not nephrogenesis through Shh. *Developmental Biology*. 2010;340(2):518-527.

Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G i Suki WN. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney International*. 2001;60(3):924-934.

Tsang JS, Ebert MS i van Oudenaarden A. Genome-wide dissection of microRNA functions and cotargeting networks using gene set signatures. *Molecular Cell*. 2010;38(1):140-153.

Uetani N i Bouchard M. Plumbing in the embryo: developmental defects of the urinary tracts. *Clinical Genetics*. 2009;75(4):307-317.

Uetani N, Bertozzi K, Chagnon MJ, Hendriks W, Tremblay ML i Bouchard M. Maturation of ureter-bladder connection in mice is controlled by LAR family receptor protein tyrosine phosphatases. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(4):924-935.

Uson A, Cox LA i Lattimer JK. Hydronephrosis in Infants and Children: I. some clinical and pathological aspects. *JAMA*. 1968;205(6):323-326.

Vaidyanathan G, Cismowski MJ, Wang G, Vincent TS, Brown KD i Lanier SM. The Ras-related protein AGS1/RASD1 suppresses cell growth. *Oncogene*. 2004;23(34):5858-5863.

Vainio S i Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nature reviews. Genetics*. 2002;3(7):533-543.

Vargiu R, Perinu A, Tintrup F, Broccia F i Lisa AD. Regional differences of energetics, mechanics, and kinetics of myosin cross-bridge in human ureter smooth muscle. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2015;7(1):34-43.

Verrecchia F i Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2002;118(2):211-215.

Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, xE, ment, Mori K, Pillebout E, xE, line, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, xE, rard, Barasch J i Terzi F. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 120(11):4065-4076.

Vivante A, Kohl S, Hwang DY, Dworschak GC i Hildebrandt F. Single-gene causes of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans. *Pediatric Nephrology*. 2014;29(4):695-704.

Wang Y, Puri P, Hassan J, Miyakita H i Reen DJ. Abnormal innervation and altered nerve growth factor messenger ribonucleic acid expression in ureteropelvic junction obstruction. *The Journal of urology*. 1995;154(2 Pt 2):679-683.

Weber S, Moriniere V, Knuppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM, Jankauskiene A, Mir S, Montini G, Peco-Antic A, Wuhl E, Zurowska AM, Mehls O, Antignac C, Schaefer F i Salomon R. Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(10):2864-2870.

Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Neth P, Weber C i Schober A. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(3):449-454.

Widmaier EP, Raff, Hershel, Strang, Kevin T. (2008). *Vander's Human Physiology: The Mechanisms Of Body Function*. Boston

Wightman B, Ha I i Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-862.

Wilkinson LJ, Neal CS, Singh RR, Sparrow DB, Kurniawan ND, Ju A, Grieve SM, Dunwoodie SL, Moritz KM i Little MH. Renal developmental defects resulting from in utero hypoxia are associated with suppression of ureteric beta-catenin signaling. *Kidney International*. 2015;87(5):975-983.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI i Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009;11(3):228-234.

Winyard P i Chitty LS. Dysplastic kidneys. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2008;13(3):142-151.

Witt DP i Lander AD. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Current Biology*. 1994;4(5):394-400.

Woodward M i Frank D. Postnatal management of antenatal hydronephrosis. *BJU International*. 2002;89(2):149-156.

Wu H, Ye C, Ramirez D i Manjunath N. Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PloS One*. 2009;4(10):e7566.

Wu L, Fan J i Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(11):4034-4039.

Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S i Maas R. *Eya1*-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nature Genetics*. 1999;23(1):113-117.

Yanagita M, Oka M, Watabe T, Iguchi H, Niida A, Takahashi S, Akiyama T, Miyazono K, Yanagisawa M i Sakurai T. USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;316(2):490-500.

Yanagita M, Okuda T, Endo S, Tanaka M, Takahashi K, Sugiyama F, Kunita S, Takahashi S, Fukatsu A, Yanagisawa M, Kita T i Sakurai T. Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist expressed in the kidney, accelerates tubular injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(1):70-79.

Yang H i Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(1):1484-1494.

Yang SP, Woolf AS, Yuan HT, Scott RJ, Risdon RA, O'Hare MJ i Winyard PJ. Potential biological role of transforming growth factor-beta1 in human congenital kidney malformations. *The American Journal of Pathology*. 2000;157(5):1633-1647.

Yang Y, Zhou X, Gao H, Ji SJ i Wang C. The expression of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in the stenotic tissue of congenital pelvi-ureteric junction obstruction in children. *Journal of Pediatric Surgery*. 2003;38(11):1656-1660.

Yang Y-a, Tang B, Robinson G, Hennighausen L, Brodie SG, Deng C-X i Wakefield LM. Smad3 in the mammary epithelium has a nonredundant role in the induction of apoptosis, but not in the regulation of proliferation or differentiation by transforming growth factor-beta. *Cell Growth & Differentiation*. 2002;13(3):123-130.

Yi R, Qin Y, Macara IG i Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*. 2003;17(24):3011-3016.

Yoon JY, Kim JC, Hwang TK, Yoon MS i Park YH. Collagen studies for pediatric ureteropelvic junction obstruction. *Urology*. 1998;52(3):494-497; discussion 497-498.

Yuan A, Rao MV, Veeranna i Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science*. 2012;125(Pt 14):3257-3263.

Yue D, Liu H i Huang Y. Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. *Current Genomics*. 2009;10(7):478-492.

Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, Li X, Olson EN i Wang S. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(20):8287-8292.

Zhu N, Zhang D, Chen S, Liu X, Lin L, Huang X, Guo Z, Liu J, Wang Y, Yuan W i Qin Y. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):286-293.

Biografija

Ivan Jovanović je rođen 02.03.1986. godine u Jagodini. Osnovno obrazovanje je stekao u Dvorištu, a srednje u Ćupriji završivši Medicinsku školu. Diplomirao je 20.10.2011. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalni deo diplomskog rada pod naslovom "Efekti Roksitromicina na zarastanje rana" je uradio u Laboratoriji za molekularnu biologiju ORL klinike Univerziteta u Grajfsvaldu u Nemačkoj, pod rukovodstvom dr Kristijana Šarfa, dok je teorijski deo uradio pod mentorstvom prof Marine Stamenković-Radak. Školske 2011/2012. godine je upisao doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, smer Genetika.

Od 01.11.2012. godine zaposlen je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu i angažovan na sledećim projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije:

1. Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti (OI175085), čiji je rukovodilac dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu
2. Neinvazivna i invazivna dijagnostika i perkutano lečenje suženja na račvama krvnih sudova (OI175082), čiji je rukovodilac dr Goran Stanković, redovni profesor na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu

U zvanje istraživač saradnik je izabran 2014. godine.

Stipendije i stručno usavršavanje:

„Introduction to the statistical analysis of genome-wide association studies“, od 4. do 8. jula 2016., Imperijal Koledž, London, Engleska.

„State of the Art, Novel Concepts, and Clinical Applications of Pharmacogenomics and Personalised Therapy“, od 20. do 25. avgusta 2016., Crowne Plaza, Beogradu.

Do sada je publikovao tri rada iz uže naučne oblasti u časopisima od međunarodnog značaja i jedan rad u časopisu od nacionalnog značaja. Takođe je autor devet kongresnih saopštenja iz uže naučne oblasti na skupovima od međunarodnog značaja, štampanih u izvodu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Иван Јовановић

Број индекса Б3043/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа експресије целокупног генома у циљу идентификације кључних гена и микро РНК за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека

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

Потпис аутора

У Београду, 06.10.2016.

Иван Јовановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Јовановић

Број индекса Б3043/2011

Студијски програм Биологија

Наслов рада

Анализа експресије целокупног генома у циљу идентификације кључних гена и микро РНК за настанак урођених анормалија бубрега и уринарног тракта човека

Ментори

др Александра Станковић, научни саветник, Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке „Винча“

др Катарина Зељић, доцент, Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 06.10.2016.

Иван Јовановић

Изјава о коришћењу

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

Анализа експресије целокупног генома у циљу идентификације кључних гена и микро РНК 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 Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 06.10.2016.

Потпис аутора

Иван Јовановић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.