Učinci spolnih hormona na ekspresiju izmjenjivača klora i mravlje kiseline (Cfex, Slc26a6) u organima štakora

Karaica, Dean

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:294128

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Dean Karaica

UČINCI SPOLNIH HORMONA NA EKSPRESIJU IZMJENJIVAČA KLORA I MRAVLJE KISELINE (Cfex, Slc26a6) U ORGANIMA ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Dean Karaica

EFFECT OF SEX HORMONES ON THE EXPRESSION OF CHLORIDE/FORMATE EXCHANGER (Cfex, Slc26a6) IN RAT ORGANS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Jedinici za molekulsku toksikologiju u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Davorke Breljak, dipl. ing. biol., znanstvene savjetnice, voditeljice Jedinice za molekulsku toksikologiju i dr. sc. Ivana Sabolića, dr. med., znanstvenog savjetnika, bivšeg voditelja Jedinice za molekulsku toksikologiju. Doktorski rad izrađen je u okviru Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj doktorski rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projektom broj 1481.

Posvećeno mojim roditeljima Danici i Branku

....za vaš neiscrpan trud i rad od vašeg sina....

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Davorki Breljak i nezamjenjivom dr. sc. Ivanu Sabolićuna njihovom strpljenju, prenesenom znanju, svesrdnoj pomoći, sistematičnom radu i predanosti koja je uvelike doprinjela u izradi ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem mojim roditeljima Danici i Branku koji su me od rođenja pratili, bodrili i dali sve od sebe, u svakom mogućem smislu, kako bi uopće mogao ostvariti svoje životne snove i ciljeve. Vaša nesebičnost i ljubav dali su mi snage da učim i borim se sa svakom preprekom u životu. Zbilja ste jedinstveni, moji mama i tata! Od srca Vam Hvala! Najbolji ste na svijetu!

Zahvaljujem mojoj braći Bojanu i Igoru koji su me uz roditelje također svojim lijepim riječima i djelima uvijek bodrili i podupirali na putu do spoznaje i ostvarenja osobnih želja. Dečki, znam da uvijek mogu računati na Vas!

Zahvaljujem svim svojim brižnim kolegicama Evi Heršak, Ivani Vrhovac, Carol Herak-Kramberger, Mariji Ljubojević i Jani Ivković-Dupor koje su uvijek bile spremne pomoći razgovorom i pravim savjetom u pravi trenutak ☺ Od prvog dana učinili su laboratorij ekstrazanimljivim i toplim mjestom za rad.

Zahvaljujem kolegi Vedranu Miceku u čijem sam ugodnom i veselom društvu i nikad dosadnoj suradnji naučio mnoge teoretske i praktične pristupe u radu s laboratorijskim životinjama.

Zahvaljujem kolegama Jovici Lončaru i Ivanu Mihaljeviću, njihovoj suradnici i kolegici Petri Marić te voditelju njihovog Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Tvrtku Smitalu koji su me velikodušno primili u svoju superekipu i naučili me novim molekularnim metodama. Uvijek ste otvoreni i spremni na diskusiju.

VELIKO hvala mojoj jedinoj ljubavi i supruzi Lematt! Bila si tu uz mene još od studentskih dana da podjeliš svaki važan i nevažan trenutak u mom životu i svojom neiscrpnom pozitivnom energijom si mi uvijek davala taj dodatan motiv za rad. :* ☺ :* Casablanca: "If that plane leaves the ground and you're not on it, you'll regret it. Maybe not today. Maybe not tomorrow. But soon and for the rest of your life."

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

UČINCI SPOLNIH HORMONA NA EKSPRESIJU IZMJENJIVAČA KLORA I MRAVLJE KISELINE (Cfex, Slc26a6) U ORGANIMA ŠTAKORA

Dean Karaica

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Jedinica za molekulsku toksikologiju, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Hrvatska

Izmjenjivač klora i mravlje kiseline (Cfex/Slc26a6) je transmembranski protein koji prenosi ione klora, bikarbonata, oksalata, mravlje kiseline i hidroksilne ione u sisavaca. Dosadašnja istraživanja pretpostavljaju ulogu tog proteina u nastanku oksalatnih kamenaca u urinarnom traktu, s većom učestalošću u muškaraca. Zbog slabe istraženosti u štakora, kao učestalo rabljenih pokusnih životinja, njegova lokalizacija i moguća spolno-ovisna ekspresija istražena je u različitim tkivima/organima štakora. Specifičnost anti-CFEX protutijela utvrđena je heterolognim ekspresijskim sustavom u kojemu su stanice HEK293 transfecirane cjelovitom cDNA za *rCfex*. Metodom RT-PCR, ekspresija mRNA za *rCfex* utvrđena je u tankom crijevu, bubrezima, jetri i gušterači. Imunofluorescencijskom analizom protein rCfex je lokaliziran u četkastim membranama enterocita i proksimalnih kanalića bubrega, kanalikularnim membranama hepatocita i izvodnim kanalićima gušterače. U bubrezima je kastracija smanjivala, a testosteron povećavao njegovu ekspresiju. Dakle, mRNA/protein rCfex je prisutan u različitim tkivima/organima štakora, dok je u bubrezima njegova ekspresija dominantna u mužjaka uslijed stimulacijskog učinka androgena nakon puberteta.

(153 stranica, 29 slika, 25 tablica, 306 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u biblioteci Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi: membranski prijenosnici, imunolokalizacija, spolne razlike, crijeva, bubrezi, jetra, gušterača.

Mentor: Dr. sc. Davorka Breljak, dipl. ing. biol., znanstvena savjetnica, IMI, Zagreb

Ocjenjivači:Prof.dr.sc. Gordana Lacković-Venturin, dipl. ing. biol., redoviti prof., PMF, Zagreb

Dr. sc. Tvrtko Smital, dipl. ing. biol., znanstveni savjetnik, IRB, Zagreb

Izv.prof.dr.sc. Vesna Benković, dipl. ing. biol, znanstveni savjetnik, PMF, Zagreb

Rad prihvaćen: 8. lipnja, 2016.

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

EFFECT OF SEX HORMONES ON THE EXPRESSION OF CHLORIDE/FORMATE EXCHANGER (Cfex, Slc26a6) IN RAT ORGANS

Dean Karaica

Institute for Medical Research and Occupational Health, Molecular Toxicology Unit, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Croatia

The chloride/formate exchanger (Cfex/Slc26a6) is a transmembrane protein mediating chloride, bicarbonate, oxalate, formate and hydroxyl ions transport in mammals. Previous findings support its possible role in the oxalate urinary tract stones formation, with higher incidence in men. Due to lack of data in rats, as commonly used experimental animals, its cell localization and possible sex-related expression was investigated in various rat organs/tissues. Specificity of anti-CFEX antibody was verified by *heterologous expression systems* using a full-length *rCfex* cDNA-transfected HEK293 cells. By RT-PCR, *rCfex* mRNA was detected in the kidneys, liver, pancreas and small intestine. By immunofluorescence, protein rCfex was localized in the apical membrane of enterocytes and renal proximal tubules, hepatocyte canalicular membranes, and luminal domain of pancreatic ducts. Its renal expression was downregulated by castration, and upregulated by testosteron. Therefore, the rCfex mRNA/protein is expressed in various rat organs/tissues, whereas its renal expression is male-dominant due to post-pubertal androgen stimulation.

(153 pages, 29 figures, 25 tables, 306 references, original in: Croatian language)

Doctoral thesis is deposited in the Library of Faculty of Science, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Keywords: membrane transporters, immunolocalization, sex differences, intestine, kidney, liver, pancreas.

Supervisor: Davorka Breljak, PhD, Senior Research Scientist, IMI, Zagreb

Reviewers: Gordana Lacković-Venturin, PhD, Full Professor, PMF, Zagreb

Tvrtko Smital, PhD, Scientific Advisor, Senior Research Scientist, IRB, Zagreb

Vesna Benković, PhD, Scientific Advisor, Associate professor, PMF, Zagreb

Thesis accepted: 8th June, 2016

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....8

2. LITERATURNI PREGLED 10

2.1. Membranski prijenosnici.....10

2.2. Obitelj membranskih prijenosnika otopljenih tvari 26 11

2.2.1. Tkivna distribucija i ekspresija mRNA za CFEX/Cfex 12

2.2.2. Tkivna distribucija i stanična lokalizacija proteina CFEX/Cfex 13

2.2.3. Struktura proteina CFEX/Cfex 14

2.2.4. Funkcionalna svojstva proteina CFEX/Cfex.....16

2.2.5. Fiziološka uloga proteina CFEX/Cfex 17

2.3. Spolne razlike u ekspresiji membranskih prijenosnika 19

2.3.1. Spolni hormoni i mehanizmi njihovog djelovanja 21

3. MATERIJALI I METODE.....24

3.1. MATERIJALI 24

3.1.1. Pokusne životinje.....24

3.1.2. Stanična linija.....24

3.1.3. Bakterijske stanice 24

3.1.4. Plazmidni vektori 24

3.1.5. Puferi, otopine i kemikalije.....24

3.1.6. Laboratorijska oprema i potrošni materijal 33

3.1.7. Računalni programi 35

3.2. METODE.....36

3.2.1. Uzgoj pokusnih životinja.....36

3.2.2. Gonadektomija pokusnih životinja i tretman spolnim hormonima 36

3.2.3. Određivanje relativne ekspresije mRNA za *rCfex* 37

3.2.4. Molekularno kloniranje gena rCfex 44

3.2.5. Određivanje ekspresije proteina rCfex 58

3.2.6. Određivanje stanične lokalizacija proteina rCfex.....61

3.2.7. Prikaz i statistička obrada rezultata.....63

4. REZULTATI 64

4.1. Ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim tkivima i organima štakora.....64

4.1.1. Provjera čistoće i cjelovitosti izdvojene RNA.....64

4.1.2. Ekspresija mRNA za *rCfex* u bubrezima štakora; optimizacija metode RT-PCR.....65

4.1.3. Sekvenciranje odsječka cDNA za *rCfex* umnoženog tijekom reakcije PCR 67

4.1.4. Ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim organima i tkivima štakora.....69

4.2. Molekularno kloniranje gena *rCfex* i transfekcija stanica HEK293 73

4.2.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt s kloniranom cjelovitom cDNA za rCfex.....75

4.2.2. Konstrukcija rekombinantnog plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cDNA za *rCfex* 77

4.3. Transfekcija stanica HEK293 rekombinantnim plazmidima pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* 79

4.3.1. Ispitivanje specifičnosti protutijela za rCfex (CFEX-Ab) u stanicama HEK293 transfeciranim s cjelovitom cDNA za *rCfex* 81

4.4. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex.....83

4.4.1. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u bubrezima štakora 84

4.4.2. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u crijevima štakora.....87

4.4.3. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u jetri štakora 92

4.4.4. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u gušterači štakora 94

4.5. Spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u štakora 95

4.5.1. Spolne razlike u ekspresiji rCfex u bubrezima štakora.....95

4.5.2. Ekspresija mRNA i proteina rCfex u jetri spolno zrelih štakora.....105

4.5.3. Ekspresija proteina rCfex u gušterači spolno zrelih štakora.....107

5. RASPRAVA.....109

6. ZAKLJUČCI 124

7. LITERATURA 127

8. POPIS KRATICA 148

9. ŽIVOTOPIS 152

1. UVOD

Bolest bubrežnih kamenaca (nefrolitijaza/urolitijaza) je bolest koja uključuje mnoga patofiziološka stanja uzrokovana stvaranjem kamenaca u bubregu, mokraćovodu ili mokraćnom mjehuru. Iako rijetko ugrožava život, česta je u odrasloj populaciji ljudi i prema novijim podacima bilježi povećanu prevalenciju dosežući pandemijske razmjere (Johri i sur., 2010., 2011.; Romero i sur., 2010.; Sakhaee i sur., 2012.). Navedeni porast prevalencije nefrolitijaze se primjerice udvostručio u SAD, a sličan trend zabilježen je i u većini europskih zemalja kao i u zemljama jugoistočne Azije (Romero i sur., 2010.; Sakhaee i sur., 2012.). U svijetu, prevalencija ove bolesti varira od 2-20%, a zabilježeno je da najveći rizik za razvoj nefrolitijaze tijekom života imaju muškarci u zemljama Ujedinjenih Arapskih Emirata i Saudijske Arabije (Buchholz i sur., 2003.; Indridason i sur., 2006.; Soucie i sur., 1994.). U Europi, prevalencija nefrolitijaze/urolitijaze kreće se između 2-8%, iako je jedno istraživanje zabilježilo veću prevalenciju (15%) u populaciji ruralnog dijela Grčke (u blizini grada Tebe) (Stamatiou i sur., 2006.). Donedavno se nefrolitijazu/urolitijazu smatralo akutnom bolešću, ali novija istraživanja sve više upućuju da je nefrolitijaza/urolitijaza sistemska bolest koja vodi do propadanja funkcije bubrega u obliku terminalnog stadija bubrežnog zatajenja (engl. *end-stage renal disease*). Također, sve veći broj istraživanja nefrolitijazu/urolitijazu dovodi u svezu s nizom patoloških stanja poput kronične bolesti bubrega, bolesti kostiju, povišenog krvnog tlaka, bolesti koronarnih arterija, metaboličkog sindroma, šećerne bolesti, pretilosti i dislipidemije (Ramaswamy i Shah, 2014.; Sakhaee, 2008., 2009.; Sakhaee i sur., 2012.; Taylor i sur., 2005.). U slučaju izostanka liječenja nakon stvaranja i uklanjanja prvog bubrežnog kamenca, nefrolitijaza/urolitijaza postaje kronična bolest s vjerojatnošću ponovne pojave bubrežnog kamenca u više od 50% slučajeva tijekom perioda od 10 godina (Bissig i sur., 1994.; Johri i sur., 2010.; Ljunghall i Danielson, 1984.; Sakhaee, 2009.; Sakhaee i sur., 2012.; Uribarri i sur., 1989.). Time uzrokuje značajni financijski teret za oboljele i tvrtke u kojima su oboljeli zaposleni, kao i za zdravstveni sustav zbog povećanih troškova liječenja uslijed uklanjanja ponavljajućih bubrežnih kamenaca (Johri i sur., 2010.; Sakhaee, 2009.). Primijećeno je da je incidencija ove bolesti, iz dosad nepoznatih razloga, najveća kod odraslih bijelaca muškog spola, a najmanja kod mladih afro-amerikanki (Romero i sur., 2010.).

Prema većini dosadašnjih istraživanja, nefrolitijaza/urolitijaza se smatra rijetkom pojavom u dječjoj dobi i svega ~1-3% djece je zahvaćeno ovim patofiziološkim poremećajem (Borghi i sur., 1990.; Sarkissian i sur., 2001.; Sas i sur., 2010.; Spivacow i sur., 2008.; Vahlensieck i sur., 1982.). Suprotno tome, nekoliko recentnih studija pokazuju porast učestalosti nefrolitijaze/urolitijaze na godišnjoj razini kod djece i adolescenata u zapadnim zemljama, poput SAD i Islanda (Dwyer i sur., 2012.; Edvardsson i sur., 2005.; Sas i sur., 2010.; Spivacow i sur., 2008.; VanDervoort i sur., 2007.). No, treba istaknuti da su navedene studije uključivale različite periode analize (2-25 godina), geografske lokacije i dobne skupine, nekada ne diskriminirajući djecu i adolescente. Ipak, dva istraživanja koja su diskriminirala između dobnih skupina pokazala su da je godišnji porast učestalosti nefrolitijaze/urolitijaze tijekom analiziranog perioda od 11 i 25 godina povezan uz predadolescentsku (9-13 godina) i adolescentsku dob (13-19 godina) (Dwyer i sur., 2012.; Sas i sur., 2010.).

Jedan od glavnih činitelja koji doprinosi razvoju nefrolitijaze/urolitijaze u ljudi je endogeni oksalatni ion koji nastaje kao krajnji produkt metabolizma glioksilata u stanicama jetre, tj. hepatocitima (Coe i sur., 2005.; Hoppe i sur., 2006.; Sakhaee, 2009.). Pri tome u većini slučajeva (~80%) kalcijske bubrežne kamence tvore teško topljive soli kalcijeva oksalata (CaOx monohidrata ili dihidrata), te u nešto manjem udjelu (~15%) soli kalcijeva fosfata (CaP) (Brzica i sur., 2009a.; Coe i sur., 2005.; Evan i sur., 2005.; Mandel i Mandel, 1989.; Sakhaee i sur., 2012.; Yoshida i Okada, 1990.). Patofiziološki mehanizmi koji doprinose stvaranju kalcijskih bubrežnih kamenaca (CaOx i CaP) su kompleksni i različiti, a osim dehidracije, tj. smanjenog volumena urina mogu uključivati poremećaje pH vrijednosti urina, hiperurikozuriju, hipocitraturiju, hiperkalciuriju i hiperoksaluriju (Sakhaee i sur., 2012.).

Poremećaji pH vrijednosti urina (kiseli pH $\leq$ 5,5 ili lužnati pH $\geq$ 6,7) povećavaju vjerojatnost stvaranja kalcijskih kamenaca u bubregu pacijenata koji boluju od nefrolitijaze. Ako se niže pH vrijednosti urina zadrže tijekom dužeg vremenskog razdoblja, urin biva zasićen nedisociranom mokraćnom, tj. uričnom kiselinom koja potpomaže kristalizaciju CaOx (Coe, 1978.; Pak i Arnold, 1975.; Sakhaee i sur., 2012.). No, hiperurikozurija je, kao izolirani poremećaj, zastupljena u svega 10% pacijenata s kalcijskim bubrežnim kamencima, ali u kombinaciji s ostalim metaboličkim poremećajima taj se postotak može znatno povećati (Preminger, 1992.; Sakhaee i sur., 2012.). Iako točan patofiziološki, tj. fizikalno-kemijski mehanizam koji bi pridonio stvaranju kalcijskih bubrežnih kamenaca u stanju hiperurikozurije nije razjašnjen, jedno istraživanje ukazuje da povećan unos purina putem npr. konzumacije mesa može uzrokovati povećanu sintezu mokraćne kiseline koja na neki, još nerazjašnjen,

način pridonosi kristalizaciji CaOx (Coe, 1978.; Sakhaee i sur., 2012.). Nasuprot tome, druga istraživanja pokazuju da se smanjenim unosom purina putem hrane ne mijenja izlučivanje mokraćne kiseline, te da u ~1/3 pacijenata endogena sinteza mokraćne kiseline prevladava nad mogućim povećanim unosom purina (Coe i Parks, 1981.; Sakhaee i sur., 2012.). Vrlo lužnati pH urina, s druge strane, može povećati količinu monohidrogen fosfata koji s kalcijem tvori termodinamički nestabilni brušit ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), a potom teško topljivi kristal hidroksiapatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$].

Hipocitraturija ili smanjeno izlučivanje citrata, endogenog inhibitora koji sprječava razvoj kalcijskih kamenaca u urinu, zastupljena je kod 20-60% svih pacijenata s kalcijskom nefrolitijazom (Pak, 1994.; Sakhaee i sur., 2012.). U slučaju nedostatka citrata u urinu, izostaje proces formiranja topljivih kompleksa i sprječavanje zasićenja urina kalcijskim solima, te inhibiranje procesa kristalizacije CaOx (Kok i sur., 1986.; Sakhaee i sur., 2012.). Nadalje, hiperkalciurija je zastupljena u 30-60% odraslih osoba s nefrolitijazom čime predstavlja poremećaj s najvećom prevalencijom kod pacijenata koji boluju od kalcijskih bubrežnih kamenaca. Uočeno je da patofiziološki mehanizmi, kao što su hiperapsorpcija kalcija u crijevima, smanjena reapsorpcija kalcija u bubregu i povećano otpuštanje kalcija iz kostiju, mogu doprinijeti hiperkalciuriji koja bi mogla povećati rizik od stvaranja kalcijskih bubrežnih kamenaca (Sakhaee i sur., 1985., 2011., 2012.; Sutton i Walker, 1980.; Worcester i Coe, 2008.).

Povećana razina oksalata u urinu ili hiperoksalurija zastupljena je u 10-50% svih osoba s kalcijskim bubrežnim kamencima, a prema dosadašnjim istraživanjima čini se da su oksalatni i kalcijevi ioni podjednako važni u procesu zasićenja i posljedične kristalizacije CaOx u urinu (Brzica i sur., 2013.; Sakhaee, 2009.; Sakhaee i sur., 2012.). Patofiziološki mehanizmi koji dovode do hiperoksalurije uključuju: 1) povećanu sintezu oksalata uslijed mutacije gena u metabolizmu glioksilata, 2) povećani unos oksalata hranom i osiguravanje njegove biodostupnosti u organizmu i 3) povećanu apsorpciju oksalata u crijevima (Brzica i sur., 2013.; Holmes i sur., 2001.; Sakhaee i sur., 2012.).

Endogeni oksalatni ion nastaje u peroksisomima hepatocita iz glioksilata (preteča oksalata) djelovanjem enzima alanin-glioksilat aminotransferaze (AGAT). Ostatak glioksilata metabolizira se u citosolu hepatocita do glikolata djelovanjem enzima glioksilat reduktaza/hidroksipiruvat reduktaze (GRHPR) (Belostotsky i sur., 2010.; Danpure i Jennings, 1986.; Giafi i Rumsby, 1998.; Holmes i Assimos, 1998.; Johri i sur., 2010.; Sakhaee, 2009.).

Do sada su otkrivene mutacije gena *AGAT* i *GRHPR* koje uzrokuju ili smanjenje njihove ekspresije i/ili aktivnosti ili njihovo pogrešno usmjeravanje u stanične odjeljke (engl. *trafficking*); tako enzim AGAT može biti pogrešno usmjeren u mitohondrije umjesto u peroksisome. Svi navedeni poremećaji uzrokuju povećanu proizvodnju oksalata i nastanak primarne hiperoksalurije tipa I (mutacije gena *AGAT*) i primarne hiperoksalurije tipa II (mutacije gena *GRHPR*) (Brzica i sur., 2013.; Sakhaee, 2009.; Sakhaee i sur., 2012.). Usprkos tome što je utvrđena veza između navedenih mutacija i hiperoksalurije, još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno kako promjene u aktivnostima spomenutih enzima dovode do razvitka hiperoksalurije i nastanka oksalatnih bubrežnih kamenaca (Monico i sur., 2011.; Sakhaee i sur., 2012.).

Većina oksalata (~85-90%) je endogenog podrijetla i posljedica je metabolizma glioksilata u hepatocitima, dok je ostatak oksalata (~10-15 %) egzogenog podrijetla i u organizam se unosi hranom bogatom oksalatom uključujući lisnato povrće (špinat), začine (cimet i kurkumu) čokoladu, voće (brusnice i agrumi) (Brzica i sur., 2013.; Chen i sur., 2003.; Hautmann, 1993.; Williams i Wilson, 1990.). U normalnim fiziološkim uvjetima oksalat se apsorbira u tankom crijevu i u određenom udjelu u debelom crijevu (Lindsjö i sur., 1989.; Sakhaee i sur., 2012.). No, primjerice u poremećaju poput enteričke hiperoksalurije pretpostavljeno je da dolazi do povećane "propusnosti" (apsorpcije) za oksalat koja je potpomognuta prisutnošću neapsorbiranih žučnih soli i masti u lumenu crijeva. Naime, žučne soli i masti vežu divalentne ione u lumenu crijeva i tako indirektno povećavaju količinu slobodnog oksalata koji se potom povećano apsorbira i posljedično izlučuje bubrezima povećavajući rizik od stvaranja oksalatnih kamenaca (CaOx) (Dobbins i Binder, 1976.; Sakhaee i sur., 2012.).

S druge strane, istraživanja su pokazala da bakterije poput *Eubacterium lentum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis* i *Oxalobacter formigenes* mogu razgrađivati oksalat u lumenu crijeva i tako pridonijeti smanjenoj apsorpciji oksalata iz konzumirane hrane (Hatch i Freel, 2005.; Sakhaee i sur., 2012.). Jedno takvo istraživanje koje je uključivalo oralnu primjenu bakterija *Oxalobacter formigenes* u pacijenata s tipom I primarne hiperoksalurije pokazalo je smanjenje izlučivanja oksalata urinom (Milliner, 2006.). No, zbog nedovoljne istraženosti takve vrste terapije na različitim grupama pacijenata s nefrolitijazom, teško je procijeniti njezinu terapijsku učinkovitost i značaj (Sakhaee, 2009.).

Također, pokazano je da i drugi parametri poput klime, sezone, zanimanja i izloženosti stresu također mogu doprinijeti povećanom riziku za razvoj nefrolitijaze/urolitijaze. Primjerice, život i rad u vrućoj okolini i prakticiranje redovitog napornog vježbanja često dovode do dehidracije i posljedično do smanjenog volumena urina, pa se time povećava i rizik od stvaranja bubrežnog kamenca (Johri i sur., 2010., 2011.).

Iako se struktura i sastav bubrežnih kamenaca može razlikovati ovisno o različitim egzogenim i endogenim činiteljima, najveću učestalost pojave imaju bubrežni kamenci građeni od kalcijeva oksalata s manjim udjelom kalcijeva fosfata dok najmanju prevalenciju imaju kamenci građeni od struvita ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$; magnezijeva amonijeva fosfata), aminokiseline cistina, amonijevih soli i teško topivih metabolita i lijekova (npr. aciklovir, amoksicilin, sulfonamidi, sulfazalazin, triamtereni, idanavir, metotraksat, primidone i silicij) (**Tablica 1)** (Brzica i sur., 2013.; Daudon i sur., 1995.; Johri i sur., 2010., 2011.).

Tablica 1. Sastav i relativna prevalencija bubrežnih kamenaca (Johri i sur., 2010.).

Sastav	**Relativna prevalencija**
Kalcijev oksalat (čisti) ili s malim udjelom kalcijeva fosfata	59%
Kalcijev fosfat (čisti)	10%
Mokraćna kiselina	17%
Struvit	12%
Cistin i ostalo	2%

Prijašnja istraživanja otkrila su proteine koji imaju sposobnost vezanja i prijenosa oksalatnih iona kroz staničnu membranu epitelnih stanica u različitim organima sisavaca uključujući glodavce i ljude (Alper i Sharma, 2013.; Alvarez i sur., 2004.; Brändle i sur., 1998.; Chernova i sur., 2005.; Karniski, 1998.; Schnedler i sur., 2011.; Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.). Riječ je o trima membranskim prijenosnicima koji pripadaju nadobitelji prijenosnika otopljenih tvari (engl. *Solute carriers;* SLC za čovjeka ili Slc za životinje): 1) Slc26a1/Sat-1 (engl. *Sulfate anion transporter 1* - prijenosnik sulfatnog aniona), 2) Slc26a3/Dra (engl. *Downregulated in adenoma – protein čija je ekspresija snižena u adenomu)*, ili CLD (engl. *Chloride anion exchanger – izmjenjivač aniona klora*) i 3) Slc26a6/Cfex (engl.

Chloride/formate exchanger – izmjenjivač klora i mravlje kiseline); ili Pat-1 (engl. *Putative anion transporter 1 – pretpostavljeni prijenosnik aniona*) (Bissig i sur., 1994.; Hoglund i sur., 1996.; Knauf i sur., 2001.; Lohi i sur., 2000.; Schweinfest i sur., 1993.; Waldegger i sur., 2001.). No, iako su prijašnja istraživanja pokazala da sva tri navedena prijenosnika otopljenih tvari mogu obavljati prijenos oksalatnog aniona u sisavaca, jedino je za protein Cfex utvrđeno da je njegova odsutnost u organizmu miševa povezana s nastankom urolitijaze. Naime, istraživanja u miševa *Cfex*$^{-/-}$ kojima je inaktiviran gen *Cfex* pokazala su da protein mCfex transportira ione oksalata u tankom crijevu i bubrezima miševa (Danpure, 2001.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.; Wang i sur., 2005.). U dva neovisna soja *Cfex* KO miševa uočeno je da učestalo razvijaju hiperoksalemiju, hiperoksaluriju i kristale kalcijeva oksalata u urinarnom traktu (urolitijazu) u odnosu na miševe divljeg tipa *Cfex*$^{+/+}$ (engl. *wild-type*), sugerirajući fiziološku ulogu proteina Cfex u regulaciji razine oksalata (Aronson, 2006.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.). Unatoč provedenim istraživanjima, još uvijek je nejasno je li opažena hiperoksalurija u miševa *Cfex*$^{-/-}$ isključivo uvjetovana hiperapsorpcijom oksalata u enterocitima crijeva ili i nedostatkom funkcije proteina Cfex u proksimalnim kanalićima bubrega (Freel i sur., 2006.). No, kako bi se razriješilo pitanje o mogućoj pato/fiziološkoj ulozi proteina CFEX/Cfex u sisavaca, potrebno je provesti detaljna istraživanja stanične lokalizacije i razine ekspresije mRNA i proteina CFEX/Cfex u različitim tkivima/organima ljudi i pokusnih životinja. Većina trenutno dostupnih podataka o tkivnoj distribuciji mRNA i proteina Cfex, te njegovoj staničnoj lokalizaciji, opisana je u miševa (Alvarez i sur., 2004.; Knauf i sur., 2001.; Petrović i sur., 2002., 2003a.; Wang i sur., 2002., 2005.; Xie i sur., 2002.), Međutim, slična istraživanja u čovjeka (Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.; Waldegger i sur., 2001.) i štakora (Gholami i sur., 2012.; 2013.; Knauf i sur., 2001.; Petrović i sur., 2003b.) su malobrojna i nepotpuna.

Prijašnja istraživanja pokazuju da muškarci srednje životne dobi izlučuju više oksalata, kalcija i magnezija urinom i da je incidencija urolitijaze u muškaraca spomenute dobi 2-3 puta veća negoli u žena. Međutim, spolna razlika u korist muškaraca nije utvrđena u vrlo mladoj i starijoj dobnoj skupini (Brzica i sur., 2013.; Dall'era i sur., 2005.; Kohri i sur., 1991.; Lemann i sur., 1996.; Liebman i Costa, 2000.). Iako su rezultati prijašnjih istraživanja pokazali da bi utvrđene spolne razlike u ljudi srednjih godina mogle biti posljedica veće tjelesne mase i površine tijela (Lemann i sur., 1996.; Liebman i Costa, 2000.), novija istraživanja pokazuju da je učestalost oksalatnih kamenaca u izravnoj vezi sa spolom, a ne s tjelesnom masom (Daudon i sur., 2004., 2006.). Također, iako neki autori sugeriraju da veća incidencija urolitijaze

muškaraca srednje dobi potencijalno može biti posljedica mutacija recesivnih gena vezanih uz X kromosom, kao što je gen *GLCN-5* koji uzrokuje hipofosfatemijski rahitis i Dentovu bolest (Watts, 2005.), drugi upućuju da ovakvi tipovi mutacija nisu odgovorni za pojavu idiopatskih slučajeva mokraćnih kamenaca (Brzica i sur., 2013.).

Spolne razlike u oksalatnoj urolitijazi su osim u ljudi utvrđene i u pokusnih životinja, tj. štakora tretiranih etilen-glikolom kod kojih je testosteron stimulirao, a estrogen inhibirao stvaranje oksalatnih kamenaca (Brzica i sur., 2013.; Lee i sur., 1996.). Dodatno, rezultati Gholami i sur., (2013.) pokazali su da je ekspresija proteina Cfex u epitelnim stanicama maternice štakora regulirana spolnim hormonima. Navedeni podaci ukazuju da bi spolni hormoni mogli biti odgovorni za spolne razlike u razvoju i incidenciji oksalatne nefrolitijaze u štakora i ljudi. Nadalje, uočeno je da spolni hormoni reguliraju opseg ekspresije brojnih membranskih prijenosnika tvari na razini transkripcije i translacije u bubrezima glodavaca (Sabolić i sur., 2007.). Međutim, spolno-ovisna ekspresija glasničke RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) i proteina CFEX/Cfex u bubrezima i drugim organima ljudi i glodavaca nije do sada istraživana.

1.1. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom da se štakori učestalo rabe kao pokusne životinje, od velike je važnosti opisati tkivnu distribuciju, staničnu lokalizaciju i razinu ekspresije mRNA i proteina rCfex u različitim tkivima/organima štakora kako bi se mogla procijeniti njegova moguća uloga u budućim pato/fiziološkim, farmakološkim i toksikološkim istraživanjima.

Kako je nedovoljno istražena ekspresija proteina rCfex u štakora djelomično posljedica i nedostatka specifičnih anti-rCfex protutijela, potrebno je ispitati specifičnost istih za potrebe imunokemijske analize proteina.

Budući je u ljudi i glodavaca, uključujući i štakora, uočena spolno-ovisna incidencija urolitijaze, pretpostavljamo da bi razina ekspresije mRNA i proteina Cfex u organima štakora (rCfex) mogla biti ovisna o spolu, tj. regulirana spolnim hormonima.

Stoga, ciljevi ovog doktorskog rada su:

1) Konstruirati rekombinantni plazmidni vektor s kloniranom cjelovitom komplementarnom DNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) za *rCfex* kojime će se transfecirati stanice HEK293 (engl. *Human Embrionic Kidney cells 293*)

2) Ispitati specifičnost komercijalno dostupnog poliklonskog protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) u heterolognom ekspresijskom staničnom sustavu metodom imunofluorescencijske analize upotrebom stanica HEK293 koje su transfecirane rekombinantnim plazmidom s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*.

3) Istražiti ekspresiju mRNA za *rCfex* metodama klasičnog i/ili kvantitativnog RT-PCR-a (engl. *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* – Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom), te odrediti staničnu lokalizaciju i ekspresiju proteina rCfex metodama imunofluorescencijske i western analize u različitim organima/tkivima štakora (lat. *Rattus norvegicus*) soja Wistar:

- Bubrezi (lat. *renes*)
- Tanko crijevo (lat. *intestinum tenue*):
  - Dvanaesnik (lat. *duodenum*)
  - Tašto crijevo (lat. *jejunum*)

        - Vito crijevo (lat. *ileum*)
    - Debelo crijevo (lat. *intestinum crassum*):
        - Slijepo crijevo (lat. *intestinum caecum*)
        - Debelo crijevo (lat. *intestinum colon*)
    - Jetra (lat. *hepar*)
    - Gušterača (lat. *pancreas)*

4) Istražiti moguće spolne razlike u ekspresiji rCfex na razini mRNA (metodom RT-PCR) i proteina (imunofluorescencijskom i western analizom) u bubrezima i ostalim organima spolno zrelih štakora.

5) Ispitati učinke gonadektomije, tj. kastracije u mužjaka i ovarijektomije u ženki na ekspresiju proteina rCfex metodama imunofluorescencijske i western analize.

6) Ispitati učinke spolnih hormona (testosterona, estradiola i progesterona) u kastriranih mužjaka na ekspresiju proteina rCfex metodama imunofluorescencijske i western analize.

Dobiveni rezultati ovog doktorskog rada podrobno će opisati staničnu lokalizaciju i razinu ekspresije mRNA i proteina rCfex te njegovu moguću spolno-ovisnu ekspresiju u različitim tkivima/organima štakora. Nova saznanja mogla bi pridonijeti boljem razumijevanju pato/fiziološke uloge proteina CFEX/Cfex u nastanku urolitijaze/nefrolitijaze i drugih pato/fizioloških procesa u pokusnih životinja i ljudi.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Membranski prijenosnici

Membrana je osnovna stanična struktura koja obavija citoplazmu svih stanica (plazma membrana) i njihove stanične organele. Njezina osnovna funkcija je održavanje sastava citoplazme, tj. reguliranje ulaska i izlaska različitih endogenih i egzogenih tvari. Zbog svoje kemijske strukture (dvosloj fosfolipida), membrana je nepropusna za mnogobrojne molekule i ione, a njihov prijenos kroz membrane stanica i staničnih organela posredovan je membranskim proteinima, tj. prijenosnicima (engl. *transporters*) koji su prisutni u eukariotskim stanicama svih organizama, uključujući i sisavce (He i sur., 2009.; Vasiliou i sur., 2009.). S obzirom na strukturu i mehanizme prijenosa možemo ih podijeliti u kanale za vodu, ionske kanale, ABC prijenosnike (engl. *ATP-binding casettes*) i membranske prijenosnike otopljenih tvari (Lin i sur., 2015.; Vasiliou i sur., 2009.). U čovjeka je dosada otkriveno 395 različitih membranskih prijenosnika otopljenih tvari koji prenose mnogobrojne supstrate endogenog i egzogenog podrijetla, a razvrstani su u 52 obitelji unutar nadobitelji SLC, pri čemu se prijenosnici u ljudi označavaju velikim slovima (SLC), a u životinjama malima (Slc) (He i sur., 2009.; Hediger i sur., 2013.; Lin i sur., 2015.; Schlessinger i sur., 2013.). Endogeni supstrati uključuju: aminokiseline, oligopeptide, glukozu i ostale šećere, (an)organske katione i anione, žučne soli, esencijalne metale, biogene amine, neurotransmitere, vitamine, masne kiseline, lipide, nukleozide i hormone, a egzogeni supstrati uključuju različite toksine i mnogobrojne lijekove (He i sur., 2009.; Sabolić i sur., 2011.). Kao izmjenjivači aniona (engl. *anion exchangers*) prvotno su otkriveni proteini unutar obitelji SLC4 koji posreduju u elektroneutralnoj izmjeni izvanstaničnih iona klora za unutarstanične ione bikarbonata čime doprinose održavanju vrijednosti pH i koncentraciji iona klora unutar stanice, te posljedično reguliraju volumen stanica (Nozawa i sur., 2004.). Potom je u ljudi i glodavaca, uključujući miševe i štakore, otkrivena obitelj SLC26 čiji članovi posreduju u prijenosu/izmjeni anorganskih aniona poput klorida, sulfata, jodida, bikarbonata i drugih (Alper i Sharma, 2013.; Bissig i sur., 1994.; Everett i sur., 1997.; Hästbacka i sur., 1994.; Hoglund i sur., 1996.; Kere i sur., 1999.; Lohi i sur., 2000.; Schweinfest i sur., 1993.).

2.2. Obitelj membranskih prijenosnika otopljenih tvari 26

Obitelji SLC26 pridruženo je 11 gena (*SLC26A1-A11*; *SLC26A10* je pseudogen) koji kodiraju za izmjenjivače aniona i anionske kanale. Prva četiri člana obitelji SLC26 otkrivena su sredinom devedesetih godina prošlog tisućljeća, dok su preostali otkriveni početkom ovog tisućljeća. Članovi obitelji SLC26/Slc26 pronađeni su u svim poznatim carstvima živih bića što upućuje na njihovu biološku važnost (Alper i Sharma, 2013.; Alvarez-Leefmans i Delpire, 2009.; Everett i Green, 1999.; Li i sur., 2014.). Proteini obitelji SLC26 smješteni su u plazmatskim membranama stanica različitih organa sisavaca, gdje posreduju prijenos različitih supstrata, propuštajući i/ili izmjenjujući ione klorida (Cl^-) za ione bikarbonata (HCO_3^-), sulfata (SO_4^{2-}), oksalata (Ox^{2-}), jodida (I^-), hidroksilnih iona (OH^-) i iona mravlje kiseline ($HCOO^-$) (Alper i Sharma, 2013.; Bissig i sur., 1994.; Jiang i sur., 2002.; Soleimani, 2001.; Xie i sur., 2002.). Proteini ove obitelji imaju važnu ulogu u nizu fizioloških procesa poput razvoja kostura (Hästbacka i sur., 1994.), sinteze tiroidnog hormona (Everett i sur., 1997.), transepitelnog prijenosa iona natrija i klora (Hoglund i sur., 1996.; Knauf i sur., 2001.; Xie i sur., 2002.), izlučivanja bikarbonata u distalnim dijelovima nefrona (Royaux i sur., 2001.), izlučivanja oksalata u crijevima i bubrezima (Brzica i sur., 2013.; Freel i sur., 2006.; Holmes i Assimos, 2004.; Jiang i sur., 2006.), proizvodnji bronhijalne sluzi (Nakagami i sur., 2008.; Nakao i sur., 2008.) i izlučivanja bikarbonata u lumen izvodnih kanalića gušterače. Među članovima obitelji SLC26, dosada su identificirane tri mutacije gena *SLC26A* (*SLC26A2*, *SLC26A3* i *SLC26A4*) koje su povezane s pojavom bolesti u ljudi poput hondrodisplazije (*SLC26A2*), kloridne dijareje (*SLC26A3*), nesindromske gluhoće DFNB4 i Pendred sindroma, tj. gluhoće koju karakterizira uvećani vestibularni akvadukt i često eutiroidna gušavost (*SLC26A4*) (Alper i Sharma, 2013.; Everett i Green, 1999.; Hästbacka i sur., 1994.; Ito i sur., 2011.; Jackson i sur., 2012.; Mount i Romero, 2004.; Schweinfest i sur., 2006.; Sharma i sur., 2011.; Sheffield i sur., 1996.; Wedenoja i sur., 2011.). Za razliku od navedenih, prava pato/fiziološka uloga ostalih sedam članova obitelji proteina SLC26A još nije u potpunosti razjašnjena. Dodatno, u miševa s inaktiviranim genima unutar obitelji *Slc26* uočen je nastanak određenih patofizioloških stanja poput urolitijaze (*Slc26a6* i *Slc26a1*), nesindromske gluhoće (*Slc26a5*), želučane hipokloridije (*Slc26a7* i *Slc26a9*), distalne renalne tubularne acidoze (*Slc26a7*) i neplodnosti kod muškog spola (*Slc26a8*) (Dawson i sur., 2010.; Demitrack i sur., 2010.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.; Liu i sur., 2003.; Markovich, 2011.; Toure i sur., 2007.; Xu i sur., 2009.). Pokazano je da navedene mutacije u membranskim domenama ili domeni STAS (engl. *Sulphate Transporter and AntiSigma factor*

antagonist) proteina Slc26 uzrokuju poremećaj u funkcionalnoj ekspresiji spomenutih proteina, najčešće u obliku poremećenog transporta do stanične membrane i zadržavanja proteina u endoplazmatskom retikulumu (Li i sur., 2014.). Tako je u ekspresijskom sustavu stanica HEK293 uočeno smanjenje transportne aktivnosti i ekspresije proteina SLC26A2 zbog mutacija R279W, Q454P, C653S i A715V, te zadržavanje proteina u endoplazmatskom retikulumu zbog mutacija ΔV340 i G678V (Karniski, 2004.). Dodatno, kod mutanata R279W i A386V izraženih u ekspresijskom sustavu oocita *X. laevis* uočeni su poremećaji u transportu i smanjenje ekspresije kod mutanta R279W, ali ne i kod mutanta A386V (Heneghan i sur., 2010.). Mutacije u domeni STAS proteina SLC26A3 (npr. I544N) i SLC26A4 (npr. H723R) uzrokuju nepravilno smatanje (engl. *folding*) STAS domene i zadržavanje proteina SLC26A3 u endoplazmatskom retikulumu, ili funkcionalni poremećaj proteina SLC26A3 (Choi i sur., 2009.; Dorwart i sur., 2007.; Yoon i sur., 2008.). Također, mutacije gena *SLC26A8* (R87Q, E812K i R954C), čiji je protein lokaliziran u testisima, smanjuju stabilnost i mogućnost aktivacije proteina CFTR (engl. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)* (Dirami i sur., 2013.; Li i sur., 2014.) koji zajedno s proteinima obitelji SLC26 regulira apsorpciju kloridnih i izlučivanje bikarbonatnih iona u različitim epitelnim stanicama (Alper i Sharma, 2013.; Dorwart i sur., 2007.; Ko i sur., 2002., 2004.).

2.2.1. Tkivna distribucija i ekspresija mRNA za CFEX/Cfex

Izmjenjivač klora i mravlje kiseline SLC26A6/CFEX je prvi član obitelji SLC26 koji je otkriven pretraživanjem javno dostupnih baza podataka, a potom je cjelovita cDNA gena *SLC26A6* klonirana iz različitih ljudskih tkiva (Lohi i sur., 2000.; Mount i Romero, 2004.). Nakon toga, *Cfex* je kloniran iz bubrega miševa (*Mus musculus*); bubrega, debelog crijeva i gušterače zamorca (*Cavia porcellus*); cijelog organizma zebrice (*Danio rerio*) i različitih tkiva kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) (Bayaa i sur., 2009.; Boyle i sur., 2015.; Knauf i sur., 2001.; Stewart i sur., 2011.). Tkivna raspodjela i razina ekspresije mRNA za *CFEX/Cfex* u čovjeka i glodavaca, uključujući miševe i štakore, istražena je metodama northern analize i RT-PCR-a. Tako je mRNA za *CFEX/Cfex* pronađena u različitim tkivima čovjeka (bubrezi, gušterača, srce, skeletni mišić, jetra, posteljica, pluća i mozak) (Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.; Waldegger i sur., 2001.), miševa (bubrezi, tanko crijevo, testisi, mozak, skeletni mišić, srce, želudac, pluća i jetra) (Alvarez i sur., 2004.; Knauf i sur., 2001.; Petrović i sur., 2003a.; Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.) i štakora (bubrezi i maternica) (Gholami i sur., 2012.; Petrović i sur., 2003b.). Nadalje, northern analizom opisane su zonske razlike u

ekspresiji mRNA za *mCfex* duž crijeva u miševa, pri čemu je njegova ekspresija veća u tankom u odnosu na debelo crijevo (Wang i sur., 2002.). U bubregu štakora su northern analizom uočene zonske razlike u ekspresiji mRNA za *rCfex*, pri čemu je veća ekspresija zabilježena u kori u odnosu na srž (Petrović i sur., 2003b.). Dosadašnja istraživanja su otkrila postojanje samo jedne izoforme mRNA/proteina Cfex u miševa i štakora. Tako mRNA za *mCfex* sadrži 3329 pb od kojih 2208 pb kodiraju za sintezu proteina od 735 aminokiselinskih ostataka (Aronson, 2002.; Dawson i sur., 2012.; Garcia-Perez i sur., 2012.; Jiang i sur., 2002.; Knauf i sur., 2001.; Ohana i sur., 2013.; Song i sur., 2012.; Wang i sur., 2002.; Whittamore i sur., 2013.; Xie i sur., 2002.) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), a mRNA za *rCfex* sadrži 2543 pb od kojih 2277 pb kodiraju za sintezu proteina od 758 aminokiselinskih ostataka (Fraga i sur., 2006.; Gholami i sur., 2012.; Simão i sur., 2013.) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Za razliku od štakora i miševa, u čovjeka je opisano šest različitih transkripcijskih varijanti koje kodiraju za 6 izoformi proteina CFEX (Corbetta i sur., 2009.; Freel i sur., 2009.; Ignatovich i sur., 1999.; Li i sur., 2014.; Lohi i sur., 2000.; Markovich, 2001.; Singla i sur., 2010.; So i sur., 2010.; Waldegger i sur., 2001.; Xie i sur., 2002.) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

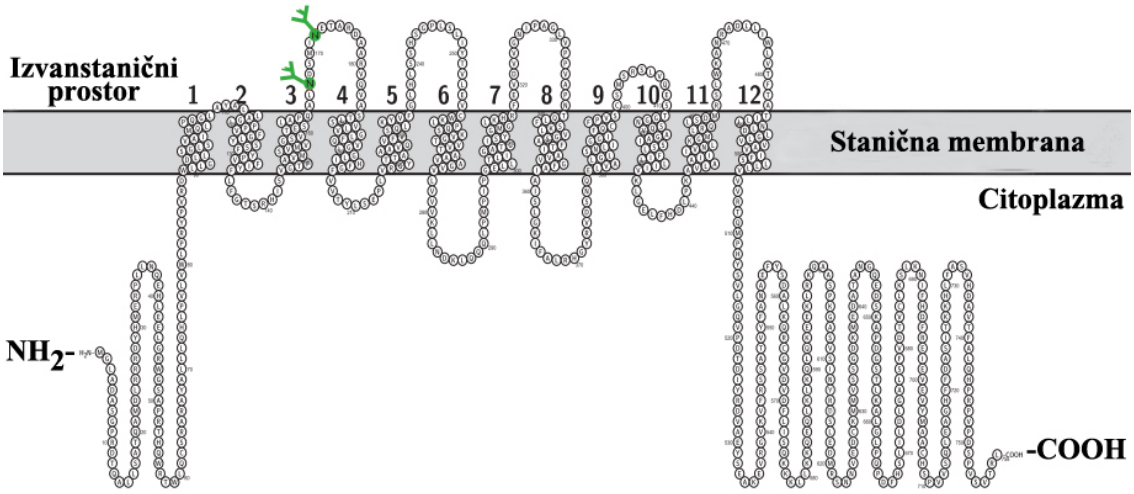
2.2.2. Tkivna distribucija i stanična lokalizacija proteina CFEX/Cfex

Tkivna distribucija i stanična lokalizacija proteina CFEX/Cfex u različitim organima sisavaca istraživana je metodama imunocitokemijske i western analize. Prve imunokemijske analize u tkivima čovjeka otkrile su staničnu lokalizaciju proteina CFEX u četkastoj membrani (engl. *brush border membrane;* BBM) i bazolateralnoj membrani (engl. *basolateral membrane;* BLM) proksimalnih kanalića bubrega i apikalnoj membrani izvodnih kanalića gušterače (Lohi i sur., 2000.). Druga skupina istraživača pronašla je njegovu lokalizaciju u BBM distalnih dijelova nefrona uključujući tanki i debeli uzlazni krak Henleove petlje, stanice guste pjege, distalne zavijene kanaliće i interkalirajuće stanice sabirnih kanalića (Kujala i sur., 2005.). Osim toga, u čovjeka je protein CFEX još dodatno pronađen u apikalnoj membrani stanica bogatih mitohondrijima (engl. *Apical mitohondria-rich cells*; AMRC) smještenih u kanalićima pasjemenika (lat. *ductus epididymis*) i u apikalnoj membrani necilijarnih stanica tipa 1 i 2 smještenih u odvodnim kanalićima (lat. *ductuli efferentes*) glave pasjemenika (Kujala i sur., 2007.). U različitim sojevima miševa (Swiss black, C57/BL, C57/BL/6J), protein mCfex pronađen je u BBM proksimalnih kanalića bubrega, parijetalnih stanica želuca i enterocitima tankog crijeva (dvanaesnika), te u plazmatskoj membrani kardiomiocita

(Alvarez i sur., 2004.; Knauf i sur., 2001.; Petrović i sur., 2002., 2003a.; Wang i sur., 2002., 2005.). U različitih sojeva štakora (Sprague-Dawley i WKY), protein rCfex je imunolokaliziran u BBM proksimalnih kanalića smještenim u kori bubrega, apikalnoj membrani izvodnih kanalića gušterače i apikalnoj membrani luminalnih i žljezdanih epitelnih, te stromalnih stanica maternice (Gholami i sur., 2013.; Ko i sur., 2004.; Petrović i sur., 2003b.). Također, Petrović i sur., (2003b). opisali su zonske razlike u ekspresiji proteina rCfex duž nefrona, pri čemu je njegova ekspresija veća u kori u odnosu na vanjski i unutarnji tračak bubrega. Nadalje, dosadašnji rezultati western analize detektirali su proteinske vrpce za CFEX/Cfex različitih molekulskih masa. Tako su u staničnim membranama, izdvojenim iz stanica HEK293 i MDCK (engl. *Madin-Darby Canine Kidney cells*) koje su transfecirane sa cDNA za *CFEX,* uočene proteinske vrpce za CFEX različitih molekulskih masa, u rasponu od 84-200 kDa (Li i sur., 2014.; Waldegger i sur., 2001.). Suprotno tome, u staničnim membranama izdvojenim iz stanica HEK293 koje su transfecirane sa cDNA za *mCfex* i staničnim membranama izdvojenim iz bubrega, srca i dvanaesnika miševa (Alvarez i sur., 2004.; Knauf i sur., 2001.; Wang i sur., 2002., 2005.), te bubrega i maternice štakora (Gholami i sur., 2012.; Petrović i sur., 2003b.), uočene su proteinske vrpce za Cfex veličine 85-90 kDa.

2.2.3. Struktura proteina CFEX/Cfex

Trodimenzionalna struktura proteina CFEX/Cfex i drugih članova obitelji SLC26 još uvijek nije otkrivena (Alper i Sharma, 2013.). Međutim, upotrebom različitih računalnih programa za predviđanje broja transmembranskih domena (npr. MEMSAT i TMpred), predloženi su strukturni modeli koji pretpostavljaju da su proteini obitelji SLC26, uključujući i SLC26A6 (CFEX), građeni od 10-14 (Alper i Sharma, 2013.), točnije 10-12 transmembranskih α-uzvojnica s NH_2- i COOH-krajevima smještenim u citoplazmi (**Slika 1**) (Aravind i Koonin, 2000.; Li i sur., 2014.; Lohi i sur., 2000., 2003.; Moseley i sur., 1999.; Mount i Romero, 2004.; Saier i sur., 1999.; Waldegger i sur., 2001.). Rezultati istog istraživanja pokazali su da većina članova obitelji SLC26, uključujući i SLC26A6 (CFEX), posjeduje nekoliko *N*-glikozilacijskih mjesta na drugoj izvanstaničnoj petlji (**Slika 1**). Međutim, nađeno je da član A8 obitelji SLC26 nije glikoziliran, a član A11 ima samo jedno *N*-glikozilacijsko mjesto na četvrtoj izvanstaničnoj petlji (Li i sur., 2014.).



Slika 1. Shematski prikaz sekundarne strukture proteina CFEX. Protein CFEX je integralni membranski protein koji se sastoji od 12 transmembranskih domena s amino (NH_2-) i karboksilnim (COOH-) krajevima smještenim u citoplazmi stanice. Sadrži 5 unutarstaničnih i 6 izvanstaničnih petlji od kojih se na drugoj nalaze dva *N*-glikozilacijska mjesta (označena zelenom bojom). Preuzeto i modificirano prema Li i sur., 2014.

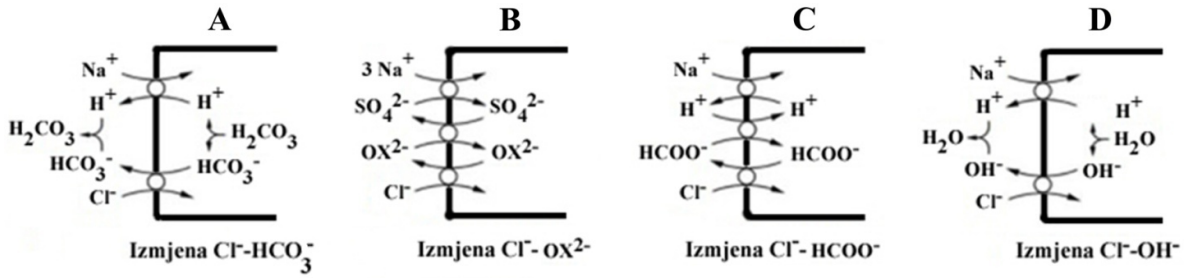
Dodatno, utvrđeno je da zadnje tri aminokiseline (T-R-L) smještene na COOH-kraju proteina CFEX sačinjavaju domenu PDZ (engl. *PSD-95 Discs-large ZO-1 homology*). Na primjeru proteina CFTR prethodno je pokazano da je domena PDZ važna za njegovo usmjeravanje prema apikalnoj plazma membrani, ali i ostvarivanje interakcije s drugim proteinima koji sadrže istu domenu. (Lohi i sur., 2000.; Moyer i sur., 1999.). U skladu s time, kako je protein CFEX lokaliziran na apikalnoj membrani epitelnih stanica gušterače i proksimalnih kanalića bubrega, predloženo je da domena PDZ uvjetuje usmjeravanje proteina CFEX prema apikalnoj membrani epitelnih stanica (Lohi i sur., 2000.). Dosada je pronađeno da barem pet članova obitelji SLC26 mogu formirati makromolekularne komplekse jer posjeduju vezujuću domenu PDZ koja im omogućuje interakciju sa tzv. *scaffolding* proteinima (Lohi i sur., 2002.). Primjerice, SLC26A3 može formirati komplekse s proteinima kao što su E3KARP i CAP70, a Slc26a7 s proteinima E3KARP i NHERF (Lamprecht i sur., 2002.; Lohi i sur., 2003.; Rossmann i sur., 2005.). Osim spomenutih proteina iz obitelji SLC26 pokazano je da i protein CFTR može vezati iste *scaffolding* proteine kako bi stvorio sličan makromolekularni kompleks (Wang i sur., 1998., 2000.). Nadalje, utvrđeno je da protein CFTR u tom kompleksu utječe na aktivnost proteina Slc26a3, SLC26A4 i Slc26a6 (Ko i sur., 2002., 2004.). Kod članova obitelji SLC26 dodatno je utvrđeno da na svom COOH kraju, osim domene PDZ, posjeduju domenu STAS (Alper i Sharma, 2013.; Aravind i Koonin, 2000.; Li i sur., 2014.). Pokazano je da pomoću domene STAS, proteini Slc26a3 i Slc26a6 također mogu povratno

aktivirati protein CFTR i tako ostvariti finu regulaciju izlučivanja tekućine i elektrolita (iona bikarbonata i klora) iz stanica u kojim se nalaze (Dorwart i sur., 2007.; Ko i sur., 2002., 2004.; Wang i sur., 2006.).

2.2.4. Funkcionalna svojstva proteina CFEX/Cfex

Prva istraživanja funkcije proteina SLC26A6/CFEX, eksprimiranog u jajašcima žabe *X. laevis*, pokazala su da protein CFEX sudjeluje u izmjeni iona klora (Cl^-) za ione mravlje kiseline ($HCOO^-$), te je stoga dobio i naziv izmjenjivač klora i mravlje kiseline (Aronson, 2006.; Knauf i sur., 2001.). Nadalje, provedena istraživanja u heterolognom ekspresijskom sustavu stanica HEK293, pokazala su da proteini CFEX/mCfex mogu izmjenjivati ione klora za širok spektar supstrata uključujući i druge anione poput Ox^{2-}, HCO_3^-, SO_4^{2-}, OH^-, SCN^-, NO_3^-, te laktat i masne kiseline s kratkim i srednje dugačkim lancima (Alvarez i sur., 2004.; Chernova i sur., 2005.; Jiang i sur., 2002.; Ko i sur., 2002.; Knauf i sur., 2001.; Lohi i sur., 2003.; Nozawa i sur., 2004.; Ohana i sur., 2011.; Shcheynikov i sur., 2006.; Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.). Također, pokazano je da proteini CFEX/mCfex mogu posredovati izmjenu aniona u kombinaciji: Cl^-/Ox^{2-}, Cl^-/HCO_3^- i Ox^{2-}/SO_4^{2-} (Jiang i sur., 2002.; Lohi i sur., 2003.; Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.). Naime, u *in vitro* studijama provedenim u jajašcima žabe *X. laevis* i stanicama HEK293 transfeciranim sa cDNA za *mCfex* utvrđeno je da su elektrogene izmjene Cl^- za HCO_3^- (1 Cl^-/2 HCO_3^-), SO_4^{2-} i Ox^{2-}, te elektroneutralna izmjena aniona klora za hidroksilne anione i anione mravlje kiseline posredovane izmjenjivačem proteina mCfex (Alvarez i sur., 2004.; Aronson, 2006.; Jiang i sur., 2002.; Ko i sur., 2002.; Mount i Romero, 2004.; Ohana i sur., 2011.; Shcheynikov i sur., 2006.; Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.). Suprotno tome, u oocitama *X. laevis* koje su transfecirane sa cDNA za *CFEX*, nije detektirana elektrogena izmjena aniona Cl^-/HCO_3^- unatoč prisutnoj elektrogenoj izmjeni Cl^-/Ox^{2-} (Alper i Sharma, 2013.; Chernova i sur., 2005.; Dorwart i sur., 2007.). Nadalje, rezultati istraživanja kompeticije aniona pokazali su da protein mCfex ima veći afinitet za vezanje oksalata u odnosu na $HCOO^-$, Cl^-, HCO_3^- i SO_4^{2-}, zbog čega je pretpostavljano da bi izmjena oksalatnog aniona mogla imati važan fiziološki značaj (Jiang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.). Rezultati navedenih istraživanja ukazali su na moguće modele unosa NaCl posredstvom proteina CFEX/Cfex kroz apikalnu membranu proksimalnih kanalića bubrega i drugih tkiva (**Slika 2**). Tako je pretpostavljeno je da bi izmjenjujući ione klora (iz lumena bubrežnih kanalića) za ione mravlje kiseline (iz citoplazme epitelnih stanica

proksimalnih kanalića bubrega), protein mCfex mogao pridonijeti u reapsorpciji NaCl u bubrezima, ali i u transepitelnom prijenosu Cl^- u drugim organima poput gušterače i srca (Knauf i sur., 2001.). No, do danas je nejasno koji od predloženih modela posreduje prikazani prijenos aniona u fiziološkim uvjetima (Aronson, 2006.).



Slika 2. Shematski prikaz modela unosa NaCl posredstvom proteina CFEX/Cfex na apikalnoj membrani epitelne stanice. Prikazana je izmjena iona klora za: **A.** Bikarbonatne ione. **B.** Oksalatne ione. **C.** Ione mravlje kiseline. **D.** Hidroksilne ione. Preuzeto i modificirano prema Aronson, 2006.

Sumarno, iako je fiziološka uloga proteina CFEX/Cfex u različitim organima sisavaca (ljudi i glodavaca) trenutno predmetom rasprave u znanstvenoj zajednici, dosadašnja funkcionalna istraživanja u heterolognim sustavima ekspresije proteina CFEX/Cfex ukazuju na činjenicu da protein CFEX/Cfex ima visok afinitet vezanja oksalatnih i bikarbonatnih iona koje u zamjenu za ione klora izbacuje iz unutrašnjosti stanice preko stanične membrane (Aronson, 2006.; Chernova i sur., 2005.; Jiang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.).

2.2.5. Fiziološka uloga proteina CFEX/Cfex

Transepitelna apsorpcija aniona klora i izlučivanje aniona bikarbonata, prisutnih u tjelesnim tekućinama svakog organizma, ima važnu pato/fiziološku ulogu u reguliranju pH i volumena stanica u ljudi i glodavaca (Boron, 2004.; Casey i sur., 2010.; Chernova i sur., 2005.; Ohana i sur., 2011.). Stoga izmjenjivači aniona obitelji SLC26, uključujući i protein CFEX/Cfex, igraju važnu ulogu u održavanju homeostaze organizma budući da reguliraju različite fiziološke procese kao što su održavanje staničnog volumena, regulacija razine elektrolita i održavanje acido-bazne ravnoteže u staničnim i izvanstaničnim tekućinama (Alper i Sharma, 2013.; Alvarez-Leefmans i Delpire, 2009.; Lohi i sur., 2000.; Ohana i sur., 2011.; Wang i sur., 2006.). Fiziološka uloga proteina mCfex istraživana je *in vivo* u miševa *Cfex*$^{-/-}$ s inaktiviranim

genom *Cfex,* u kojima je uočena smanjena izmjena iona klora i bikarbonata u BBM izdvojenim iz bubrega i dvanaesnika u odnosu na miševe divljeg tipa *Cfex*$^{+/+}$ (Wang i sur., 2005.). Dosadašnje studije ukazale su na moguću tkivno-specifičnu ulogu proteina Cfex. Tako je primjerice pokazano da u epitelnim stanicama dvanaesnika i bubrega (Aronson, 2006.; Petrović i sur., 2003b.; Wang i sur., 2002., 2005.), te gušterače glodavaca, protein Cfex poglavito sudjeluje u apsorpciji kloridnih i sekreciji bikarbonatnih iona (Alper i Sharma, 2013.; Stewart i sur., 2011.; Wang i sur., 2006.). Zbog toga je prvo predloženo da bi sekrecijom bikarbonatnih iona u zamjenu za apsorpciju iona klora, protein Cfex mogao doprinijeti zaluživanju i zaštiti epitela početnog dijela tankog crijeva od želučanog sadržaja niske pH vrijednosti (Aronson, 2006.; Petrović i sur., 2003b.; Wang i sur., 2002., 2005.). Naime, prijenos bikarbonata u lumen dvanaesnika ujedno osigurava optimalnu pH vrijednost neophodnu za aktivnost probavnih enzima, dok njegov prijenos u lumen izvodnih kanalića gušterače potencijalno sprječava preuranjenu aktivnost proenzima acinusnih stanica.

Pritom su rezultati istih i narednih istraživanja ukazali na postojanje visokog afiniteta za vezanje oksalata, te je predloženo da je druga fiziološka uloga proteina CFEX/mCfex, osim izmjene Cl^-/HCO_3^- poglavito u epitelnim stanicama bubrega i crijeva, vjerojatno vezana uz izmjenu Cl^-/Ox^{2-} u istim organima sisavaca (Aronson, 2006.; Jiang i sur., 2002.; Wang i sur., 2002., 2005.; Xie i sur., 2002.). U skladu s time je, netom nakon otkrića stanične lokalizacije i ekspresije proteina mCfex u bubregu i tankom crijevu miševa (Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.), te spoznaje da je apsorpcija oksalata iz hrane bitan čimbenik koji doprinosi njegovom povećanom izlučivanju putem bubrega (Holmes i sur., 2001.), po prvi put pretpostavljeno da bi mutacije gena *CFEX* (uz mutacije gena *SLC26A1/SAT-1*) mogle biti važan čimbenik u određivanju rizika stvaranja bubrežnih kamenaca ili nefrolitijaze (Xie i sur., 2002.). Dodatno, istraživanja funkcije proteina mCfex u organima miševa *Cfex*$^{-/-}$ pokazala su da nedostatak ovog proteina u okvirima fizioloških uvjeta uzrokuje: 1) mjerljivu promjenu u izmjeni Cl^-/Ox^{2-} iona u bubregu i Cl^-/HCO_3^- u tankom crijevu (dvanaesniku) čime se ujedno remeti transepitelni elektroneutralni prijenos (apsorpcija/reapsorpcija) iona Na^+ i Cl^- u proksimalnim kanalićima bubrega (Aronson, 2006.; Wang i sur., 2002., 2005.), 2) pad izlučivanja, tj. povećanje apsorpcije oksalata u tankom crijevu (dvanaesniku i vitom crijevu), čime se direktno doprinosi pojavi povećane koncentracije oksalata u krvi (hiperoksalemije) i urinu (hiperoksalurije), i 3) konačno stvaranje bubrežnih kamenaca u urinarnom traktu (urolitijazu) u obliku kristala kalcijeva oksalata (Aronson, 2006.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.; Wang i sur., 2005.). Stoga, trenutno se pretpostavlja da povećana apsorpcija oksalata u

crijevima miševa *Cfex* KO uzrokuje hiperoksalemiju, hiperoksaluriju i posljedično urolitijazu sugerirajući moguću pato/fiziološku ulogu proteina mCfex u regulaciji razine oksalata u organizmu i nastanku oksalatnih bubrežnih kamenaca (Alper i Sharma, 2013.; Aronson, 2006.; Brzica i sur., 2009a., 2013.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.).

Dakle, iz dosada navedenih istraživanja (Alper i Sharma, 2013.; Aronson, 2006.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.; Wang i sur., 2005.) razvidno je da protein Cfex ima nekoliko mogućih fizioloških uloga od kojih je, uz zadaću izmjene Cl^-/HCO_3^- iona u bubrezima, tankom crijevu i gušterači te transepitelni prijenos/reapsorpciju NaCl u bubregu, uloga u sprječavanju nastanka patofiziološkog stanja nefrolitijaze/urolitijaze u sisavaca postala žarištem nedavnih ispitivanja.

2.3. Spolne razlike u ekspresiji membranskih prijenosnika

Dosadašnja istraživanja u ljudi i glodavaca otkrila su postojanje spolnih razlika u procesima transporta mnogobrojnih endogenih i egzogenih supstrata u različitim organima uključujući crijeva, jetru, mozak i bubrege (Antón i sur., 1986.; Kleinman i sur., 1966.; Morissette i sur., 1990.; Morris i sur., 2003.; Orzes i sur., 1985.; Sibug i sur., 1996.; Uhland-Smith i DeLuca, 1993.). Nadalje, spolne razlike u farmakokinetici i farmakodinamici različitih tvari, koje doprinose razlikama u procesima apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja tvari iz organizma, dobro su poznate i utvrđene u ljudi i životinja (Bonate, 1991.; Fletcher i sur., 1994.; Harris i sur., 1995.; Mattison, 2013.; Morris i sur., 2003.; Soldin i Mattison, 2009.). Naime, upotrebom različitih pokusnih životinja (uglavnom miševa i štakora), utvrđeno je da spolni hormoni utječu na prijenos tvari u bubrezima tako što reguliraju ekspresiju različitih membranskih prijenosnika na razini transkripcije (mRNA) i/ili translacije (proteini) (Sabolić i sur., 2007.). Drugim riječima, učinak spolnih hormona na ekspresiju i aktivnost određenih prijenosnika tvari mogao bi razjasniti uočene spolne razlike u fiziološkim, farmakološkim i toksikološkim studijama (Sabolić i sur., 2007.). Tako su istraživanja mnogih autora pokazala da je ekspresija membranskih prijenosnika u različitim organima glodavaca ovisna o spolu, tj. regulirana spolnim hormonima. Primjerice, u bubrezima glodavaca uočene su spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina koji pripadaju dvjema nadobiteljima: ABC i SLC (Morris i sur., 2003.; Sabolić i sur., 2007., 2011.). Tako je pokazano da je ekspresija mRNA/proteina bubrežnih prijenosnika nadobitelji ABC: Mrp1, Mrp3, Mrp4, Mrp5 (engl. *Multidrug resistance-associated protein 1,3,4,5)*, Mdr1a, Mdr1b, Mdr2 (engl. *Multidrug resistance*

protein 1a, 1b, 2) i Bcrp (engl. *Breast cancer resistance protein*) ovisna o spolu (Chen i Klaassen, 2004.; Cui i sur., 2009.; Maher i sur., 2005.; Sabolić i sur., 2007., 2011.; Tanaka i sur., 2005.). Također, rastući je broj istraživanja koja pokazuju postojanje spolnih razlika u ekspresiji mRNA/proteina bubrežnih prijenosnika unutar nadobitelji SLC, uključujući prijenosnike za sljedeće supstrate: a) organske anione (Slc22a6, Slc22a7, Slc22a8, Slc22a19 i Slco1a2), b) organske katione (npr. Slc22a1, Slc22a2 i Slc47a1) (Alnouti i sur., 2006.; Asaka i sur., 2006.; Breljak i sur., 2010., 2013.; Cerrutti i sur., 2002.; Groves i sur., 2006.; Isern i sur., 2001.; Lickteig i sur., 2008.; Lu i sur., 1996.; Ljubojević i sur., 2004.; Sabolić i sur., 2011.; Simon i sur., 1999.; Terada i sur., 2006.; Urakami i sur., 1999., 2000.) i c) natrij i glukozu (Slc5a1 i Slc5a2) (Balen i sur., 2008.; Sabolić i sur., 2006., 2012.). Nasuprot tome, još je uvijek mali broj istraživanja koja se bave proučavanjem spolnih razlika u ekspresiji mRNA/proteina bubrežnih prijenosnika čovjeka (Breljak i sur., 2016.; Sabolić i sur., 2007.; Vrhovac i sur., 2015.).

Od trenutno poznatih prijenosnika oksalata (Sat-1, Cfex i Dra) koji moguće imaju značajnu ulogu u patofiziologiji nastanka nefrolitijaze/urolitijaze, dosada je istražen učinak spolnih hormona na ekspresiju prijenosnika sulfatnog aniona Sat-1 (Slc26a1). Pokazano je da je ekspresija proteina Sat-1 u bubrezima i jetri štakora ovisna o spolu, tj. regulirana spolnim hormonima. Točnije, ekspresija proteina Sat-1 veća je u mužjaka u odnosu na ženke zbog inhibitornog učinka estradiola u jetri i bubrezima štakora (Brzica i sur., 2009a.). Shodno tome, kako je prijenosnik Sat-1 lokaliziran u BLM proksimalnih kanalića bubrega, pretpostavljeno je da bi suradnja ovog proteina s drugim prijenosnikom oksalatnog aniona na apikalnoj strani epitelnih stanica bubrega, moguće proteinom CFEX/Cfex, mogla biti ključna za izlučivanje oksalata iz organizma putem urina (Aronson, 2006.; Brzica i sur., 2013.; Wang i sur., 1996.).

2.3.1. Spolni hormoni i mehanizmi njihovog djelovanja

Steroidni hormoni su lipofilne molekule, derivati kolesterola koji se sintetiziraju u testisima nadbubrežnoj žlijezdi, jajnicima i posteljici (Beato i Klug, 2000.; Li i Al-Azzawi, 2009.; Taraborrelli, 2015.). U sisavaca, gonade i nadbubrežna žlijezda sintetiziraju i izlučuju pet grupa steroidnih hormona: estrogene, progestine, androgene, glukokortikoide i mineralokortikoide koji reguliraju različite fiziološke procese u stanicama koje posjeduju receptore za iste (Beato i Klug, 2000.). Prema starijim teorijama, steroidni hormoni zbog svoje lipofilnosti prolaze kroz staničnu membranu i u citoplazmi se vežu za specifične receptore. Tako vezani/aktivirani djeluju kao transkripcijski činitelji, tj. vežu se kao homodimeri ili heterodimeri na specifične *response* elemente u promotorskim regijama ciljnih gena stimulirajući ili inhibirajući njihovu transkripciju, a time i sintezu proteina (Foradori i sur., 2008.; Heinlein i Chang, 2002a.; Quigley i sur., 1995.; Roy i sur., 1999.). Nasuprot tome, istraživanja u zadnjih par desetljeća pokazuju da učinci hormona mogu biti posredovani i tzv. negenomskim mehanizmima (Björnström i Sjöberg, 2005.; Foradori i sur., 2008.). Naime, različita istraživanja *in vitro* i *in vivo* pokazala su da steroidni hormoni mogu posredno (ne vežući se direktno na DNA) regulirati transkripciju ciljnog gena vežući se na transkripcijske čimbenike u staničnoj jezgri (Beato i Klug, 2000.; Björnström i Sjöberg, 2005.; Foradori i sur., 2008.; Göttlicher i sur., 1998.). Dodatno, pokazano je da steroidni receptori mogu aktivirati unutarstanične signalne molekule poput MAPK/ERK1/2 (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)/ERK1/2 (engl. *Extracellular-signal-regulated kinases*) putem mehanizama neovisnih o transkripciji gena (Castoria i sur., 1999.; Foradori i sur., 2008.; Migliaccio i sur., 1996., 1998.). Osim toga, utvrđeno je da steroidni hormoni mogu uzrokovati brzi stanični odgovor i kada im je onemogućen ulazak u stanicu, npr. brzi rast unutarstanične koncentracije kalcija (Ca^{2+}) (Audy i sur., 1996.; Azenabor i Hoffman-Goetz, 2001.; Benten i sur., 1998., 2001.; Foradori i sur., 2007., 2008.; Lieberherr i sur., 1993.). Bitno je istaknuti kako su ovakvi brzi efekti opisani za sve skupine steroidnih hormona, uključivši i spolne hormone (Baulieu i Robel, 1995.; Foradori i sur., 2008.; Moriarty i sur., 2006.; Wehling i sur., 2006.).

Glavni i najpotentniji estrogen u čovjeka je 17β-estradiol, dok su estron i estriol prisutni u manjim razinama. Biološki učinci estrogena posredovani su receptorima estrogena (engl. *Estrogen Receptors*; ER) α i β koji su članovi velike nadobitelji jezgrinih receptora. Navedeni receptori djeluju kao transkripcijski čimbenici aktivirani ligandom, a klasični molekularni mehanizam djelovanja ER uključuje vezanje estrogena na receptore u staničnoj jezgri, nakon čega receptori stvaraju dimere i vežu se na specifične elemente ERE (engl. *Estrogen Response*

Elements) koji se nalaze u promotorima ciljnih gena (Björnström i Sjöberg, 2005.; Nilsson i sur., 2001.). No, otkriveno je da ER mogu regulirati ekspresiju gena i na druge načine. Naime, uočeno je da je jedna trećina gena u čovjeka regulirana ER-ima unatoč tome što ne posjeduju sekvence ERE (Björnström i Sjöberg, 2005.; O'Lone i sur., 2004.). Iako točni molekularni mehanizmi kojima ER reguliraju transkripciju preko drugih *response* elemenata još nisu razjašnjeni, uočeno je da ER mogu regulirati ekspresiju gena bez direktnog vezanja za molekulu DNA. Zapravo ER mogu modulirati funkciju drugih klasa transkripcijskih čimbenika vežući se na proteine u staničnoj jezgri (Göttlicher i sur., 1998.). Dodatno, pronađeno je da određen broj gena reguliranih estrogenima posjeduje tzv. *polu-ERE* mjesta (engl. *ERE halfsites*) ili mjesta na koja se veže tzv. *orphan nuclear hormone receptor SF-1* (*SF-1 response elements* ili *SFRE*), te služe kao mjesta vezanja ERα (O'Lone i sur., 2004.; Vanacker i sur., 1999.). Također, uočeno je da su određeni učinci estrogena toliko brzi da se ne mogu objasniti klasičnim (genomskim) mehanizmom stimulacije sinteze mRNA i proteina. Navedeni brzi učinci su posredovani aktivacijom različitih kaskada protein kinaza nakon vezanja estrogena za ER smještenih na staničnoj membrani (Björnström i Sjöberg, 2005.; Falkenstein i sur., 2000.; Lösel i Wehling, 2003.; Moriarty i sur., 2006.; Revelli i sur., 1998.; Wehling, 1997.). Osim toga, pokazano je da negenomski učinci estrogena mogu posredno utjecati na ekspresiju gena aktivirajući stanične signalne putove koji naposljetku djeluju na određene transkripcijske čimbenike. Primjerice, mnogi transkripcijski činitelji poput AP-1 (engl. *Activator protein-1*) su regulirani fosforilacijom, te mogu biti meta tzv. negenomskom učinku estrogena (Björnström i Sjöberg, 2005.; Göttlicher i sur., 1998.; Lösel i Wehling, 2003.; Moriarty i sur., 2006.). No, zbog otkrića mnogih primjera u kojima podražaji s membrane, putem aktivacije signalnih kaskada u stanici, utječu na transkripciju gena, razlika između tzv. genomskih i negenomskih mehanizama postaje sve manje jasna (Moriarty i sur., 2006.).

Progesteron, kao lipofilna molekula prolazi kroz plazmatsku membranu i u staničnoj jezgri se veže na progesteronske receptore (A i B) (engl. *Progesterone Receptors*; PR) što za posljedicu ima aktivaciju 300 različitih koregulatora (koaktivatora i korepresora) nužnih za reguliranje transkripcije specifičnih gena i posljedičnu sintezu odgovarajućih proteina (Lonard i sur., 2007.; Taraborrelli, 2015.) No, dosadašnja istraživanja su, osim spomenutog genomskog (klasičnog) mehanizma djelovanja, otkrila postojanje brzih učinaka progesterona na različite stanične signalne putove, neovisne o regulaciji transkripcije gena (Lonard i sur., 2007.; Lösel i Wehling, 2003.; Taraborrelli, 2015.). Takvi negenomski učinci progesterona

karakterizirani su toliko brzim efektima (u okviru sekundi ili minuta) koji se ne mogu objasniti utjecajem na transkripciju gena i posljedičnu sintezu proteina. Osim toga, isti učinci su pronađeni u eritrocitima i krvnim pločicama koje nemaju staničnu jezgru i ne pokazuju supresiju inhibitorima za steroidne jezgrine receptore (Gellersen i sur., 2009.; Lösel i Wehling, 2003.; Revelli i sur., 1998.; Taraborrelli, 2015.). Iako nedostaju nepobitni dokazi, uvriježeno je mišljenje da negenomski učinci progesterona započinju na staničnoj površini putem specifičnih receptora vezanih uz plazmatsku membranu (Gellersen i sur., 2009.).

Androgeni, muški spolni hormoni, uglavnom se sintetiziraju u testisima i nešto manje u nadbubrežnoj žlijezdi. Njima pripadaju testosteron i 5α-dihidrotestosteron (DHT) koji su odgovorni za oblikovanje muškog fenotipa tijekom embriogeneze i za postizanje spolne zrelosti (Heemers i sur., 2006.; Li i Al-Azzawi, 2009.). Kao i kod estrogena i progesterona, testosteron i DHT većinu svojih učinaka ostvaruju vežući se na specifične receptore za androgene (engl. *Androgen Receptors*; AR) koji pripadaju velikoj nadobitelji ligandom aktiviranih jezgrinih receptora za hormone (Mangelsdorf i Evans, 1995.). Naime, testosteron i DHT se vežu za AR koji stvara dimere, veže se za specifična mjesta u ili blizu tzv. ARE (engl. *Androgen Response Elements*), te posljedično potiče transkripciju specifičnih gena (Heemers i sur., 2006.; Li i Al-Azzawi, 2009.). Osim ovog genomskog ili klasičnog učinka, sve veći broj istraživanja ukazuje da i androgeni također mogu ostvarivati brze negenomske učinke (Falkenstein i Wehling, 2000.; Li i Al-Azzawi, 2009.; Revelli i sur., 1998.; Wehling, 1997.). To obično podrazumijeva brzu indukciju kaskade drugih glasnika, uključujući porast slobodnog unutarstaničnog kalcija, aktivaciju protein kinaze A i C te MAPK, što vodi različitim staničnim odgovorima poput relaksacije glatkih mišića i neuromuskularnog prijenosa signala (Heinlein i Chang, 2002b.; Li i Al-Azzawi, 2009.). Iako je poznato da AR, PR i ER mogu aktivirati signalni put MAPK/ERK neovisno o njihovoj transkripcijskoj aktivnosti, pretpostavlja se da većina negenomskih učinaka uključuje vezanje spolnih (steroidnih) hormona za membranske receptore (Boonyaratanakornkit i sur., 2001.; Kousteni i sur., 2001.; Li i Al-Azzawi, 2009.; Migliaccio i sur., 2000.). Unatoč tome, dokazi za postojanje AR vezanog uz membranu još uvijek nisu općenito prihvaćeni (Li i Al-Azzawi, 2009.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pokusne životinje

- Štakori vrste *Rattus norvegicus* soja Wistar (Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Stanična linija

- Stanična linija bubrega ljudskog embrija HEK293T (ATCC® CRL-3216™)

3.1.3. Bakterijske stanice

- Kompetentne bakterije vrste *E. coli* soja DH5α (ThermoFisher, SAD)

3.1.4. Plazmidni vektori

- Plazmid pJET1.2/blunt (ThermoFisher Scientific, SAD)
- Plazmid pcDNA™ 3.1His/C (Invitrogen, SAD)

3.1.5. Puferi, otopine i kemikalije

3.1.5.1. *Anestezija*

- Narketan (Chassot AG (Bern, Switzerland)
- Xylapan (Chassot AG (Bern, Switzerland

3.1.5.2. *Spolni hormoni*

- Progesteron (RotexMedica GmbH, Njemačka)
- Estradiol propionat (RotexMedica GmbH, Njemačka)
- Testosteron enantat (Galenika, Srbija)
- Suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska)

3.1.5.3. *Izdvajanje RNA*

- RNA*later* (Sigma, SAD)
- *TRIzol* (Invitrogen, SAD)
- Komplet za pročišćavanje ukupne stanične RNA – *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, SAD):
    - Kolone za pročišćavanje RNA
    - Puferi za ispiranje
    - deH_2O bez nukleaza
    - Mikroepruvete za sakupljanje RNA
- Kloroform (Fisher Biotech, SAD)
- Etanol; apsolutni (Kemika, Hrvatska)
- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)

3.1.5.4. *Reakcija reverzne transkripcije*

- Komplet reagensa za reverznu transkripciju – *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, SAD):
    - Reverzna transkriptaza *MultiScribe*™; 50 U/µL
    - Pufer za reverznu transkriptazu *MultiScribe*™; 10x
    - Smjesa dNTP u jednakim omjerima: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 25x
    - Nasumične početnice (engl. *random primers*); 10x
    - Inhibitor RNaze; 20 U/µL

3.1.5.5. *Klasična lančana reakcija polimerazom*

- DNA polimeraza *AmpliTaq*®; 5 U/µL (Applied Biosystems, SAD)
- Pufer za DNA polimerazu *AmpliTaq*®; 10x (Applied Biosystems, SAD)
- DNA polimeraza *Phusion High-Fidelity*; 2 U/µL (Finnzymes, Finska)
- Pufer za DNA polimerazu *Phusion High-Fidelity*; 5x (Finnzymes, Finska)
- Smjesa dNTP u jednakim omjerima: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10 mM (Applied Biosystems, SAD)

- Parovi oligonukelotidnih početnica za umnažanje odsječka cDNA za određivanje ekspresije gena u različitim tkivima štakora; 100 μM (Invitrogen, SAD): 1) početnica F (engl. *forward primer* – početnica komplementarna 5' kraju cDNA lanca) i početnica R (engl. *reverse primer* – početnica komplementarna 3' kraju cDNA lanca) za:
  - *rCfex* (F1 i R1)
  - *rβ-aktin* (engl. *rat beta actin* – beta aktin u štakora) (F i R)
  - *rHprt1* (engl. *rat hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 1* – hipoksantin gvanin fosforibozil transferaza 1 u štakora) (F i R)
- Parovi oligonukelotidnih početnica za umnažanje cjelovite cDNA gena *rCfex*; 100 μM (Invitrogen, SAD):
  - *rCfex* (F2 i R2)
  - *rCfex* (F3 i R3)
  - *rCfex* (F4 i R4)
- Parovi oligonukleotidnih početnica za umnažanje mjesta za višestruko kloniranje (engl. *Multiple Cloning Site*; MSC) plazmidnog vektora pJET1.2 /blunt
  - pJET1.2/blunt (F i R)
- Parovi oligonukleotidnih početnica za umnažanje MSC plazmidnog vektora pcDNA^{TM}3.1/HisC
  - pcDNA^{TM}3.1/HisC (F i R)
- deH_2O bez nukleaza (Gibco, SAD)

3.1.5.6. *Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu*

- Smjesa reagensa za kvantitativni PCR u stvarnom vremenu – TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)
- Smjesa para oligonukleotidnih početnica i fluorescentno obilježenog oligonukleotida, tzv. TaqMan® sonde - *TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, SAD) za:
  - *rCfex* (Rn01445892_m1)
  - *rβ-aktin* (Rn00667869_m1)

3.1.5.7. *Elektroforetsko razdvajanje nukleinskih kiselina*

- Agaroza (Sigma, SAD)
- Etidij bromid; 10 mg/mL (Sigma, SAD)
- TAE (Tris-acetat-EDTA) pufer; pH 8:
    - 10 mM Tris (Sigma, SAD)
    - 5 mM Na-acetat (Sigma, SAD)
    - 0,5 mM EDTA (Sigma, SAD)
- Pufer za nanošenje uzoraka RNA na gel:
    - 50% glicerol (Merck, Njemačka)
    - 1 mM EDTA (Sigma, SAD)
- 0,25 % bromfenol modrilo (Sigma, SAD)
- Pufer za nanošenje produkata reakcije PCR na gel:
    - 50 % glicerol (Merck, Njemačka)
    - 1 mM EDTA (Sigma, SAD)
- 0,25 % ksilen cijanol (Sigma, SAD)
- DNA biljeg 1 – *FastRuler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific, SAD)
- DNA biljeg 2 – *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific, SAD)

3.1.5.8. *Sekvenciranje*

- Komplet za pročišćavanje produkata reakcije PCR iz gela *QIAquick Gel Purification Kit* (QIAGEN, SAD):
    - kolone za pročišćavanje DNA *QIAquick Spin*
    - Puferi
    - Mikroepruvete za sakupljanje DNA
- Komplet reagensa za sekvenciranje – *ABI PRISM BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, SAD)
- Parovi oligonukleotidnih početnica za umnažanje odsječka cDNA gena *rCfex*; 3,2 pmol (Invitrogen, SAD):
    - *rCfex* (F1 i R1)

- Parovi oligonukleotidnih početnica za umnažanje različitih odsječaka cDNA za potrebe cjelovitog sekvenciranja gena *rCfex*; 3,2 pmol (Invitrogen, SAD):
    - pJET1.2/blunt (F i R) za umnažanje MSC plazmidnog vektora pJET1.2
    - *rCfex* (F2 i R2)
    - *rCfex* (F3 i R3)

3.1.5.9. *Molekularno kloniranje gena rCfex*

- Komplet reagensa za izdvajanje i pročišćavanje produkata reakcije PCR iz gela *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN, SAD)
- Komplet reagensa za molekularno kloniranje gena - *CloneJet PCR Cloning Kit #K1231, #K1232* (ThermoFisher Scientific, SAD)
- Komplet reagensa za izdvajanje plazmidne DNA - *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, SAD)
- Restrikcijski enzimi: *EcoRI, NheI* i *ApaI* (Thermo Scientific, SAD)
- DNA polimeraza *Phusion High-Fidelity* (Finnzymes, Finska)
- Luria Bertani (LB) Broth (Sigma, SAD)
- LB Agar (Sigma, SAD)
- Ampicilin (Sigma, SAD)
- DMEM (engl. *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*) (ThermoFisher Scientific, SAD)
- Goveđi serum neokoćenog teleta (engl. *Fetal Bovine Serum*; FBS) (Biosera, Francuska)
- Polietilenimin (engl. *polyethylenimine;* PEI) (Aldrich, SAD)

3.1.5.10. *Izdvajanje ukupnih staničnih membrana*

- Homogenizirajući pufer za izdvajanje ukupnih staničnih membrana; pH 7,4:
    - 300 mM manitol (Sigma, SAD)
    - 5 mM EGTA (Sigma, SAD)
    - 12 mM Tris-HCl (Sigma, SAD)

- PMSF (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride* – fenil-metil-sulfonil fluoride); 200 mM otopina u etanolu (Sigma, SAD)
- Smjesa inhibitora proteaza (AEBSF, EDTA, bestatin, E-64, leupeptin, aprotinin) u tabletama (Sigma, SAD)

3.1.5.11. *Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu*

- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Njemačka)
- BSA (engl. *Bovine Serum Albumin* – albumin goveđeg seruma) (Sigma, SAD)
- 98-100% mravlja kiselina (Kemika, Hrvatska)

3.1.5.12. *SDS-PAGE (engl. Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - natrij dodecil elektroforeza u poliakrilamidnom gelu) i western analiza*

- Pufer za pripremu proteinskih uzoraka (Laemmli pufer):
    - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (22% v/v) (Sigma, SAD)
    - 30 % SDS (12% v/v) (Sigma, SAD)
    - 80 % glicerol (54% v/v) (Merck, Njemačka)
    - Zasićena otopina brom fenol modrila (12% v/v) (BioRad, SAD)
- Akrilamid/bisakrilamid:
    - 30 g akrilamida (Fisher Scientific, SAD)
    - 0,8 g bis-akrilamid (Fisher Scientific, SAD)
- 100 mL deH_2O
- APS (engl. *Ammonium persulfate* – amonijev persulfat): 14% otopina u deH_2O (BioRad, SAD)
- Pufer za pripremu 10 % gela za razdvajanje (donji gel): 0,5 M Tris-HCl, pH 8,9
- Pufer za pripremu 4 % gela za sabijanje (gornji gel): 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate* – natrij dodecilsulfat); 10 % otopina u deH_2O (Sigma, SAD)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-etan-1,2-diamin) (Sigma, SAD)

- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer za elektroforezu proteina:
    - 25 mM Tris (Sigma, SAD)
    - 0,2 M glicin (Sigma, SAD)
    - 1 % SDS (Sigma, SAD)
- Metanol (Kemika, Hrvatska)
- Pufer za prijenos proteina:
    - 15,6 mM Tris, pH 8,3 (Sigma, SAD)
    - 120 mM glicin (Sigma, SAD)
    - 20 % metanol (Kemika, Hrvatska)
- Otopina za bojanje proteina: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Njemačka) u otopini za odbojavanje
- Otopina za odbojavanje (metanol : octena kiselina : deH_2O u omjeru 5:1:4)
- Pufer za blokiranje; pH 7,4:
    - 5 % nemasno mlijeko u prahu (različiti proizvođači)
    - 150 mM NaCl (Kemika, Hrvatska)
    - 1 % Triton-X-100 (Merck, Njemačka)
    - 20 mM Tris-HCl (Sigma, SAD)
    - 0,02 % $NaNO_3$ (Fisher Scientific, SAD)
- BCIP (engl. *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate* – 5-bromo-4-kloro-3'-indolilfosfat p-toluidinska sol) (Sigma, SAD)
- NBT (engl. *Nitro Blue Tetrazolium chloride* – nitro-plavi tetrazolijski klorid) (Sigma, SAD)
- Tris pufer: 20 mM $(HOCH_2)_3CNH_2$ u H_2O, pH 9 (Sigma, SAD)
- Hidrofobna najlonska membrana: Immobilon PVDF (engl. *Polyvinylidene fluoride* - poliviniliden fluorid); 0,45 µm (Milipore, SAD)
- Proteinski biljeg - *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (Thermo Scientific, SAD)
- Predmetna stakalca Superfrost/Plus (Fisher Scientific, SAD)

3.1.5.13. *Rezanje tkiva kriostatom*

- Saharoza: 30 % otopina u PBS puferu (Fisher Scientific, SAD)
- Polimerni medij za uklapanje: Compound 4583 O.C.T. (Vector Labs, SAD)

3.1.5.14. *Imunofluorescencijska analiza*

- PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline* – fosfatni pufer), pH 7,4:
    - 140 mM NaCl (Kemika, Hrvatska)
    - 4 mM KCl (Kemika, Hrvatska)
    - 8 mM K_2HPO_4 (Kemika, Hrvatska)
    - 2 mM KH_2PO_4 (Kemika, Hrvatska)
- HS-PBS (engl. *High Salt-PBS*):
    - PBS
    - 1,8 % (g/v) NaCl (Kemika, Hrvatska)
- SDS: 1 % otopina u deH_2O (Sigma, SAD)
- NaN_3 (natrijev azid) (Fisher Scientific, SAD)
- Paraformaldehid: 4 % otopina u PBS puferu (Sigma, SAD)
- Ksilol (Kemika, Hrvatska)
- Etanol: 96 %, 75 % i 60 % otopina u deH_2O (Kemika, Hrvatska)
- Citratni pufer: 10 mM limunska kiselina/Tris, pH 3, pH 6 i pH 8 (Sigma, SAD)
- Triton-X-100: 0,1 %; 0,5 % i 2 % otopina u PBS puferu (Merck, Njemačka)
- BSA: 1 % otopina u PBS puferu (Sigma, SAD)
- Otopina za očuvanje fluorescencije: Vectashield (Vector Laboratories, SAD)

3.1.5.15. *Protutijela za western i imunofluorescencijsku analizu*

- Primarna protutijela:
    - Protutijelo za protein hCFEX (CFEX-Ab) – poliklonsko protutijelo proizvedeno u kozi upotrebom imunizirajućeg peptida sa C-terminalnog kraja proteina CFEX (CFEX/SLC26A6) (C17, sc-26728; Santa Cruz Biotechnology, SAD) i odgovarajući imunizacijski peptid (sc-26728 P Santa Cruz Biotechnology, SAD)
    - Protutijelo za α-podjedinicu Na^+/ K^+-ATPaze (Na/K-ATPaza-Ab) – mišje monoklonsko protutijelo (sc-48345; Santa Cruz Biotechnology, SAD)
    - Protutijelo za aktin (aktin-Ab) – mišje monoklonsko protutijelo (MAB1501R; Milipore, SAD)
    - Protutijelo za polihistidinski biljeg 6xHis u MSC plazmidnog vektora pcDNA^{TM}3.1/HisC (6xHis-Ab) – mišje monoklonsko protutijelo (Clontech Laboratories, Inc., SAD)
- Sekundarna protutijela:
    - DAG-CY3 (engl. *Donkey Anti Goat-CY3*) – magareće protutijelo protiv kozjeg imunoglobulina klase G (IgG) obilježeno fluorescencijskom bojom CY3; 1,9 μg/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)
    - GAM-AP (engl. *Goat Anti Mouse-Alkaline Phosphatase*) – kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom; 0,25 μg/mL (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, SAD)
    - GAM-FITC (engl. *Goat Anti Mouse-Fluorescein Isothiocyanate*) – kozje protutijelo protiv mišjeg IgG obilježeno fluorescencijskom bojom fluorescein-izotiocijanat; 8 μg/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)
    - RAG-AP (engl. *Rabbit Anti Goat-Alkaline Phosphatase*) – kunićje protutijelo protiv kozjeg IgG obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom; 0,6 μg/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD)

3.1.6. Laboratorijska oprema i potrošni materijal

- Uređaj za PCR: *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD)
- Uređaj za PCR: *T100 Thermal Cycler* (BioRad, SAD)
- Uređaj za PCR: *Biometra T Personal* (Biometra GmbH, Njemačka)
- Uređaj za Real-time PCR: *7500 Real Time PCR* (Applied Biosystems, SAD)
- Četverokapilarni automatski uređaj ABI PRISM 3100: *Avant DNA Genetic Analyser* (Applied Biosystems, SAD)
- UV transiluminator: FBTIV-88 (Fisher Scientific, SAD)
- Centrifuge:
    - Mikrocentrifuga s hlađenjem: 5417 R (Eppendorf, Njemačka)
    - Mini spin centrifuga (Eppendorf, Njemačka)
    - Centrifuga s hlađenjem: Sorvall RC2B, rotor SS-34 (Sorvall Instruments, SAD)
    - Ultracentrifuga: Sorvall OTD-Combi, rotor T-875 (Sorvall Instruments, SAD)
- Spektrofotometar za mjerenje koncentracije proteina: CECIL 9000 (Cambridge, Velika Britanija)
- Biospec-nano spektrofotometar za mjerenje koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina (Shimadzu, Japan)
- Termoblok: *Thermomixer Comfort* 1,5 mL (Eppendorf , Njemačka)
- Inkubator za rast i održavanje staničnih kultura (Heraeus Instruments GmbH, Njemačka)
- Inkubator za rast i održavanje bakterijskih kultura (Termo-medicinski aparati Bodalec i Havoić, Hrvatska)
- Laminar (KlimaOprema, Hrvatska)
- Električni homogenizator: *Powergen* 125 (Fisher Scientific, SAD)
- Sustav za vodoravnu elektroforezu nukleinskih kiselina u gelu agaroze: *Midigel Horizontal System* (Fisher Scientific, SAD)
- Sustav za vertikalnu elektroforezu proteina: *Mini Protean III Cell* (BioRad, SAD)
- Sustav za prijenos/transfer proteina: *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad, SAD)
- Kriomikrotom: Leica CM 1580 (Leica Instruments, Njemačka)

- Fluorescencijski mikroskop: OPTON III RS (Opton Feintechnik, Njemačka)
- Digitalna kamera: Spot RT (Diagnostic Instruments, SAD)
- Digitalni fotoaparat: OLYMPUS Camedia C-770 (Olympus, SAD)
- Konfokalni laserski pretražni mikroskop Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems, Njemačka)
- Uređaj za izvor električne struje (engl. *Power supply*): Power Pac Basic (BioRad, SAD)
- Automatske pipete s promjenjivim volumenom (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL i 100-1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Hamilton šprice s promjenjivim volumenom (1-10 µL, 1-25 µL i 1-50 µL) (Hamilton, SAD)
- Kivete za spektrofotometar (Sarstedt, Njemačka)
- Digestor
- Tehnička vaga
- Analitička vaga
- Vibracijska miješalica: *Genie 2 Vortex* (Fisher Scientific, SAD)
- Mikrovalna pećnica *Moulinex compact*
- Hladnjaci (4°C) i zamrzivači (-20°C i -80°C)
- Skener: Canon 5600F
- Računalo: Asus MSGW
- Mikrotubice za PCR (0,2 mL) (Applied Biosystems, SAD)
- Optičke mikrotubice s optičkim čepovima (0,2 mL) (Applied Biosystems, SAD)
- Mikrotubice (1,5 mL i 2 mL) (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Polipropilenske tubice s čepom (5, 15 i 50 mL) (Falcon, Njemačka)
- CitoOne® pločice s 24 jažice (Starlab GmbH, Njemačka)
- Pokrovna stakalca broj 1, kružna (Marienfeld GmbH, Njemačka)

3.1.7. Računalni programi

- Adobe Photoshop 6.0 (http://www.adobe.com)
- BioEdit (v.7.0.9.0) (http://www.ebi.ac.uk/)
- ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/)
- ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/)
- Nucleotide BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)
- Primer3 (v. 0.4.0) (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)
- STATISTICA 12 (StatSoft, SAD)
- 7500 System Software (Applied Biosystems, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj pokusnih životinja

U istraživanjima su rabljeni spolno zreli (3 mjeseca stari) i spolno nezreli (26 dana stari) štakori oba spola soja Wistar uzgojeni u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) u Zagrebu. Životinje su uzgajane u kontroliranim uvjetima s periodičnom izmjenom svjetla i tame svakih 12 sati, stalnom temperaturom od 24°C i slobodnim pristupu hrani i vodi. Životinje su žrtvovane prekidanjem vratne kralježnice nakon čega su uzorkovani različiti organi. Pokusi su odobreni od Etičkog povjerenstva IMI prigodom odobravanja znanstvenog projekta MZOS 022-0222148-2146 (voditelj: dr. sc. Ivan Sabolić, dr. med.).

3.2.2. Gonadektomija pokusnih životinja i tretman spolnim hormonima

U svrhu ispitivanja ovisnosti ekspresije proteina rCfex o spolu, štakori (starosti 6 tjedana) su gonadektomirani; mužjacima su kroz skrotum odstranjeni testisi (kastracija), a ženkama jajnici dorzalnim, tj. lumbalnim putem (ovarijektomija). Životinje su operirane uz primjenu odgovarajuće anestezije (Narketan, 80 mg/kg t.m. i Xylapan, 12 mg/kg t.m. i.p.). Životinje su žrtvovane 6 tjedana nakon postupka gonadektomije. Kao kontrole, rabljene su životinje koje su prošle sve korake operativnog zahvata, ali im nisu odstranjenje spolne žlijezde. U svrhu određivanja učinaka spolnih hormona na ekspresiju proteina rCfex, kastrirani mužjaci tretirani su sa spolnim hormonima uključujući testosteron enantat, estradiol propionat ili progesteron (2,5 mg/kg t.m. subkutano tijekom 14 dana). Budući su spolni hormoni pripremljeni u suncokretovom ulju, kontrolne životinje tretirane su suncokretovim uljem (0,5 mL/kg t.m./dan). U svakoj pokusnoj skupini bilo je 3-6 životinja.

3.2.3. Određivanje relativne ekspresije mRNA za *rCfex*

3.2.3.1. *Izdvajanje i pročišćavanje ukupne stanične RNA*

Nakon žrtvovanja, uzorci različitih tkiva i organa uronjeni su u otopinu RNA*later*, inkubirani tijekom 24 h pri 4°C, a potom pohranjeni pri -20°C do upotrebe. Ukupna stanična RNA izdvojena je pomoću otopine *TRIzola* prema uputama proizvođača. Uzorci tkiva i organa (50 mg) homogenizirani su električnim homogenizatorom *Powergen* 125 u 1 mL otopine *TRIzola* tijekom 30 sekundi pri maksimalnoj brzini, te inkubirani pri sobnoj temperaturi tijekom 5 min. Dodavanjem kloroforma (0,2 mL/mL *TRIzola*) i centrifugiranjem (1200 x g/15 min/4°C) dobivene su tri faze: donja fenol-kloroform faza crvene koja sadržava proteine, interfazni prsten bijele boje koji sadrži DNA i gornja vodena faza koja sadrži RNA. Taloženje RNA iz vodene faze izvršeno je dodatkom izopropanola g (0,5 mL) i centrifugiranjem (12000 x g /10 min/4^{o}C). Talog RNA ispran je s 75 % etanolom, a RNA istaložena centrifugiranjem (7500 x g /5 min/4^{o}C). Supernatant je bačen, a talog RNA osušen na zraku tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi. Talog RNA otopljen je u 200-300 μL deH_2O bez nukleaza. Potom je izdvojena RNA pročišćena pomoću kompleta reagensa - *RNeasy Mini Kit* prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na selektivnom vezanju RNA na kolonu, a vezana RNA eluira se pomoću deH_2O bez nukleaza. Izdvojene i pročišćene RNA pohranjene su pri -80°C do upotrebe.

3.2.3.2. *Određivanje koncentracije i čistoće izdvojene RNA*

Koncentracija izdvojene i pročišćene RNA određena je upotrebom spektrofotometra Biospec-nano mjerenjem optičke gustoće (engl. *optical density*, OD) pri valnoj duljini od 260 nm, a čistoća izdvojene RNA određena je mjerenjem OD pri valnim duljinama od 230, 260 i 280 nm, te procijenjena računanjem dvaju omjera: OD_{260}/OD_{280} i OD_{260}/OD_{230}.

3.2.3.3. *Provjera cjelovitosti izdvojene RNA elektroforezom u gelu agaroze*

Cjelovitost izdvojene RNA provjerena je UV-transiluminatorom nakon elektroforetskog razdvajanja RNA u 1 % agaroznom gelu s etidij bromidom. Agaroza je otopljena u TAE puferu zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja, ohlađena do približno 50°C te je neposredno prije izlijevanja agaroze u kalup dodan etidij bromid (0,05 µg/mL). Nakon polimerizacije gela na sobnoj temperaturi tijekom 30 min, uzorci RNA pomiješani su s puferom za nanošenje uzoraka RNA i pipetirani u jažice gela. Elektroforeza je trajala 30 min u TAE puferu pri naponu od 80 V pri sobnoj temperaturi u sustavu za vodoravnu elektroforezu *Midi Gel Horizontal System*. Po završetku elektroforeze, gel je fotografiran digitalnim fotoaparatom *Olympus Camedia* C770, a fotografije obrađene računalnim programom Adobe Photoshop 6.0.

3.2.3.4. *Reakcija reverzne transkripcije*

Reakcija reverzne transkripcije (engl. *reverse transcription*, RT), tj. sinteza cDNA provedena je pomoću kompleta reagensa *High-Capacity cDNA RT Kit* prema uputama proizvođača. Kao kalup u reakciji RT korištena je ukupna stanična RNA izdvojena i pročišćena kao što je opisano u poglavljima 3.2.3.1. - 3.2.3.3. Reakcijska smjesa za RT sadržavala je 5 µg ukupne stanične RNA, reverznu transkriptazu *MultiScribe*™ u odgovarajućem puferu, smjesu dNTP, nasumične početnice i inhibitor RNaze u ukupnom volumenu od 50 µL (**Tablica 2**). Reakcija RT provedena je u uređaju PCR 2720 pod uvjetima prikazanim u **Tablici 3**. Svaka reakcija RT uključivala je negativnu kontrolu koja je sadržavala sve komponente reakcijske smjese za RT osim kalupa RNA. Uzorci sintetizirane cDNA pohranjeni su pri -20°C do upotrebe.

Tablica 2. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju

Sastojci smjese za reverznu transkripciju	Radna otopina	Konačna koncentracija	Konačni volumen (µL)
RNA u deH_2O bez nukleaza	0,2 µg/µL	5 µg	25
Pufer za reverznu transkriptazu *MultiScribe*™	10x	1x	5
Smjesa dNTP	25x	1x	2
Nasumične početnice	10x	1x	5
***Reverzna transkriptaza *MultiScribe*™**	50 U/µL	2,5 U/µL	2,5
Inhibitor RNaze	50 U/µL	2,5 U/µL	2,5
deH_2O bez nukleaza	-	-	8
Ukupni volumen	-	-	50

*Reverzna transkriptaza *MultiScribe*™ je rekombinantna reverzna transkriptaza porijeklom iz virusa mišje leukemije (engl. *Moloney murine leukemia virus*).

Tablica 3. Uvjeti reakcije reverzne transkripcije

	Temperatura	Vrijeme
Sparivanje početnica	25°C	10 min
Sinteza cDNA	37°C	120 min
Inaktivacija reverzne transkriptaze	85°C	5 min
Hlađenje	4°C	∞

3.2.3.5. *Klasična lančana reakcija polimerazom*

Reakcijom PCR umnažani su odsječci cDNA gena *rCfex* i konstitutivno eksprimiranih (engl. *housekeeping gene*) gena: *rβ-aktin* i *rHprt1*. Reakcijska smjesa sadržavala je DNA polimerazu s odgovarajućim puferom, smjesu dNTP i specifične parove početnica (F i R) (**Tablica 4**). Kao kalup upotrijebljena je cDNA sintetizirana postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3.4.

Tablica 4. Reakcijska smjesa za klasični PCR

Sastojci smjese za PCR	Radna otopina	Konačna koncentracija	Konačni volumen (µL)
cDNA	0,1 µg/µL	100 ng	1
Pufer za DNA polimerazu *AmpliTaq*®	10x	1x	2
Smjesa dNTP	10 mM	0,2 mM	0,4
Početnica F	10 µM	0,4 µM	0,8
Početnica R	10 µM	0,4 µM	0,8
***DNA polimeraza *AmpliTaq*®**	5 U/µL	0,025 U/µL	0,1
deH_2O bez nukleaza	-	-	14,9
Ukupni volumen	-	-	25

*DNA polimeraza *AmpliTaq*® je rekombinantna DNA polimeraza porijeklom iz termofilnih bakterija *Thermus aquaticus*.

Svaka reakcija PCR uključivala je i negativnu kontrolu koja je sadržavala sve sastojke reakcijske smjese za PCR osim kalupa cDNA (engl. *no template control*, NTC). Reakcija je provedena u uređaju PCR 2720 tijekom 25-30 ciklusa pri uvjetima prikazanim u **Tablici 5**.

Tablica 5. Uvjeti reakcije za klasični PCR

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija DNA	94°C	3 min
Denaturacija DNA	95°C	30 s
Sparivanje početnica	57°C	30 s
Produljivanje lanca DNA	72°C	45 s
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	7 min

Parovi početnica za umnažanje odsječaka cDNA triju gena (*rCfex, rβ-aktin i rHprt1)* dizajnirani su pomoću računalnog programa Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (**Tablica 6**), komercijalno sintetizirani i otopljeni u deH_2O bez nukleaza, te pohranjeni pri -20°C. Smještajem početnica na dva različita egzona spriječilo se umnažanje genomske DNA.

3.2.3.6. *Elektroforeza produkata reakcije PCR u gelu agaroze*

Produkti reakcije PCR razdvajani su elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu s etidij bromidom. Priprema gela, elektroforeza, slikanje gelova i obrada fotografija opisani su u poglavlju 3.2.3.3. Veličina produkata reakcije PCR utvrđena je usporedbom s odgovarajućim DNA biljezima.

Tablica 6. Parovi početnica za umnažanje odsječaka cDNA gena *rCfex*, *rβ-aktin* i *rHprt1*

Gen	Slijed nukleotida početnica (5'→3')	Veličina odsječka cDNA (pb)	Položaj	Oznaka*
rCfex	Početnica F: GGCTCTTGGGTGACCTGTTA Početnica R: AGGTGACCACAAAACCGAAG	357	302-321 639-658	NM_001143817.1
rβ-aktin	Početnica F: GTCGTACCACTGGCATTGTG Početnica R: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	364	515-534 859-878	NM_031144.3
rHprt1	Početnica F: TGCTCGAGATGTCATGAAGG Početnica R: AGAGGTCCTTTTCACCAGCA	361	213-232 554-573	NM_012583.2

*Slijed nukleotida cDNA nalazi se u bazi podataka NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information* - Nacionalni centar za biotehnološke informacije; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

3.2.3.7. *Sekvenciranje umnoženih odsječaka cDNA gena rCfex*

Odsječci cDNA za *rCfex* su nakon elektroforetskog razdvajanja izrezani iz agaroznog gela i pročišćeni kompletom kemikalija *QIAquick Gel Purification Kit* prema uputama proizvođača. Princip pročišćavanja produkata reakcije PCR iz gela temelji se na selektivnom vezanju DNA na silikatne kolone te eluiranju pročišćene DNA s istih. Sekvenciranje, umnoženog odsječka cDNA za *rCfex* provedeno je u DNA servisu Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu. Umnoženi odsječci cDNA za *rCfex* (357 pb) sekvencirani su s 5' i 3' krajeva. Svaka reakcija za sekvenciranje sadržavala je specifičnu početnicu (3,2 pmol/L) i odsječak cDNA za *rCfex* u ukupnom volumenu od 14 µL. Za sekvenciranje je rabljen četverokapilarni automatski uređaj ABI PRISM 3100 – *Avant DNA Genetic Analyser*, komplet ABI PRISM *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* i računalni program ABI PRISM 3100. Analiza i sravnjivanje nukleotidnih sekvenci provedena je pomoću bioinformatičkih programa BioEdit v.7.0.9.0. i ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/) te Nucleotide BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

3.2.3.8. *Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu*

Relativna ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim organima i tkivima štakora određena je metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, tzv. metodom qPCR. U tu svrhu upotrijebljen je par oligonukleotidnih početnica s fluorescentno obilježenom sondom *TaqMan*® koje su komercijalno dostupne u obliku *TaqMan*® *Gene Expression Assays* (Rn01445892_m1). Ekspresija gena *rβ-aktin* (Rn00667869_m1) praćena je kao endogena kontrola za normalizaciju količine cDNA. Reakcijska smjesa za qPCR sadržavala je *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix*, *TaqMan*® *Gene Expression Assays* i cDNA (**Tablica 7**) koja je sintetizirana prema opisu u poglavlju 3.2.3.4. Svaka reakcija PCR uključivala je i NTC. Reakcija qPCR odvijala se u uređaju za qPCR 7500 *Real-Time PCR System* pri uvjetima navedenim u **Tablici 8**.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za qPCR

Sastojci smjese za qPCR	Radna otopina	Konačna koncentracija	Konačni volumen (µL)
TaqMan® Universal PCR Master Mix	2x	1x	12,5
TaqMan® Gene Expression Assay	20x	1x	1,25
cDNA	8,88	100 ng	11,25
Ukupni volumen	-	-	25

Tablica 8. Uvjeti reakcije qPCR

Uvjeti reakcije qPCR	Temperatura	Vrijeme
Predinkubacija	50°C	2 min
Denaturacija	95°C	10 min
40-50 ciklusa: Denaturacija	95°C	15 s
Sparivanje i produljivanje lanaca DNA	60°C	1 min

Relativna ekspresija mRNA za gen *rCfex* određena je komparativnom delta/delta Ct metodom (Livak i Schmittgen, 2001.) pomoću računalnog programa 7500 System Software prema opisu iz priručnika *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR* (http://www.lifetechnologies.com).

3.2.4. Molekularno kloniranje gena rCfex

3.2.4.1. *Dizajniranje početnica za molekularno kloniranje gena rCfex*

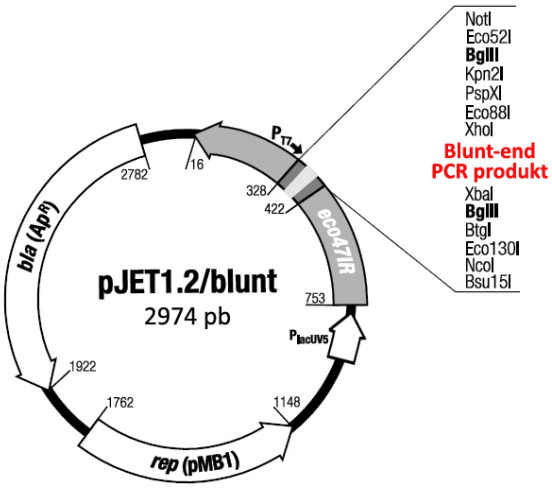
Parovi početnica za umnažanje i sekvenciranje cjelovite cDNA za *rCfex* dizajnirani su pomoću računalnog programa Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/), komercijalno sintetizirani, otopljeni u deH_2O bez nukleaza i pohranjeni pri -20^oC. Pazeći na očuvanje okvira čitanja (engl. *Open Reading Frame*; ORF) unutar plazmidnog vektora pcDNA^{TM}3.1/HisC za ekspresiju kloniranog gena *rCfex* u eukariotskim stanicama, parovima početnica F2 i R2 pridruženi su specifični nukleotidni sljedovi neophodni za cijepanje dvolančane DNA pomoću restrikcijskih enzima: *EcoRI, NheI, ApaI i XhoI* (**Tablica 9**).

Tablica 9. Parovi početnica za umnažanje cDNA za *rCfex* tijekom reakcije PCR

Parovi početnica (mjesto vezanja)	Slijed nukleotida početnica (5'→3')	Restrikcijski enzimi
Početnica F2	*TTA*G^CTAGCG^AATTCATGGGACTGCCTGATGGGT	*NheI*, *EcoRI*
Početnica R2	*TTA*GGGCC^C*T*C^TCGAGTCAGAGTTTGGTGGCCAAAAC	*ApaI*, *XhoI*
Početnica F3 (695 - 716 pb)	TCAAGTATGTGTTTGGCATCAA	/
Početnica R3 (814 - 797 pb)	TTGCTGTGACCACGGTGC	/
Početnica F4 (1400 - 1418 pb)	TCTGGAAGGCAAATCGAGT	/
Početnica R4 (1500 - 1482 pb)	GAAGACTATGGAGACTGCC	/

Dvostrukom i isprekidanom crtom označeni su specifični nukleotidni sljedovi na kojima restrikcijski enzimi cijepaju dvolančanu molekulu DNA. (^) označava mjesto cijepanja nukleotidnog slijeda. Nukleotidi u *italic-u* su dodani kako bi se tijekom kloniranja gena *rCfex* očuvao okvir čitanja unutar rabljenih plazmida.

Time je omogućeno molekularno kloniranje gena *rCfex,* tj. njegovo izrezivanje (engl. *excision*) ili spajanje (engl. *ligation)* s plazmidnim vektorima: pJET1.2/blunt (**Slika 3 i Tablica 10**) i pcDNA^{TM}3.1/HisC (**Slika 4 i Tablica 11**).

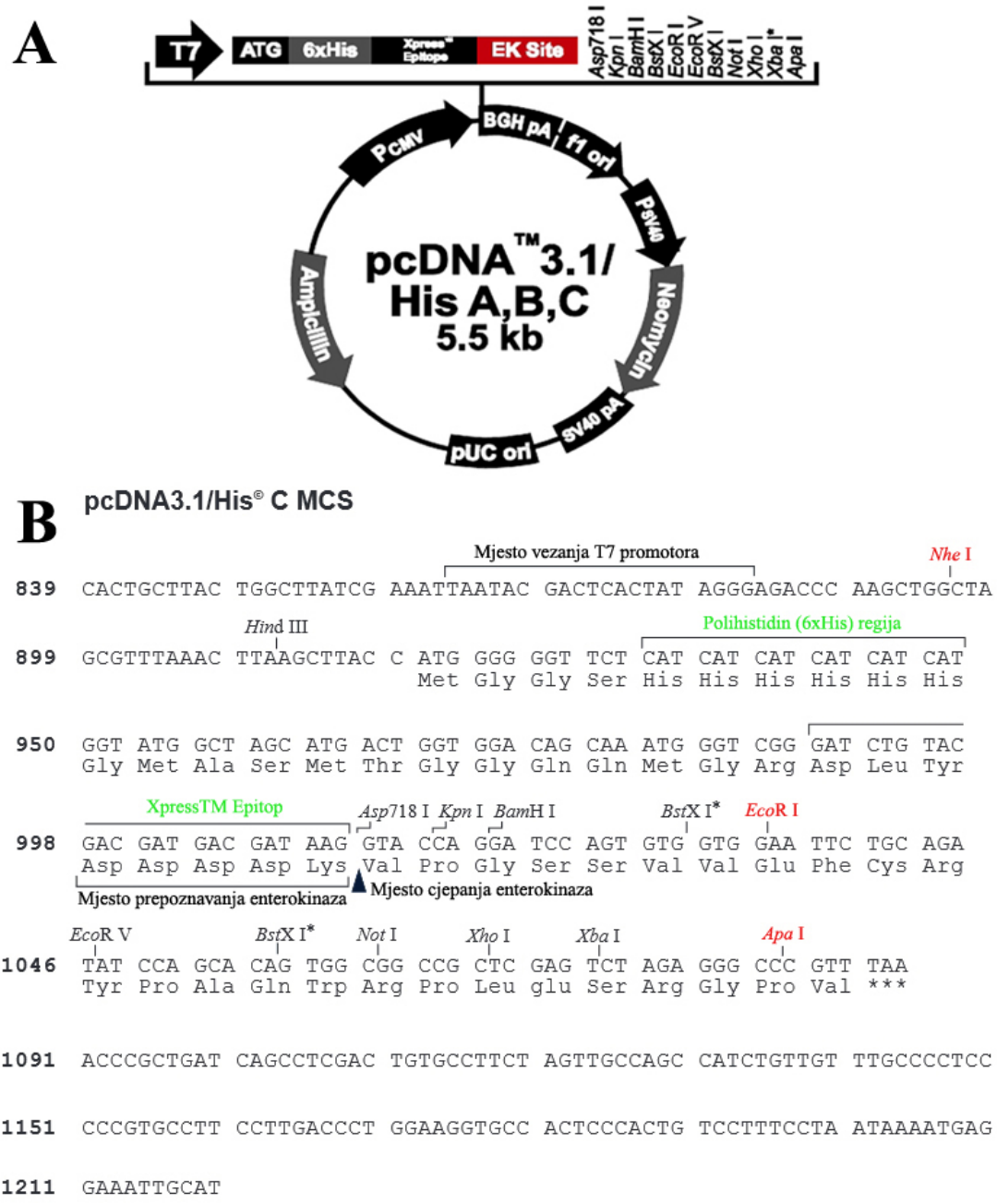


Slika 3. Mapa plazmidnog vektora pJET1.2/blunt

Tablica 10. Genetski elementi plazmidnog vektora pJET1.2/blunt

ELEMENT	FUNKCIJA	MJESTO (pb)
Replikon (rep) (pMB1)	omogućava replikaciju plazmida pJET1.2/blunt	1762 - 1148
Ishodište replikacije (engl. *origin*)	Omogućava inicijaciju replikacije	1162 ± 1
***bla*(Ap^R)**	Gen za enzim β-laktamazu omogućava otpornost na ampicilin i pozitivnu selekciju rekombinantnih bakterija	2782 - 1922
eco47*IR*	Gen eco47*IR* omogućava pozitivnu selekciju rekombinantnih bakterija	753 - 16
P$_{lacUV5}$	P$_{lac}$ promotor osigurava dovoljnu razinu ekspresije gena eco47*IR* i tako omogućava pozitivnu selekciju rekombinantnih bakterija	305 - 324
MSC	Omogućava spajanje i izrezivanje inserta	422 - 328
Tupi krajevi DNA (engl. *blunt DNA ends*)	Omogućuju kloniranje inserta s tupim krajevima	371 - 372
Početnica pJET1.2 F **Početnica pJET1.2 R**	Omogućuju sekvenciranje ukloniranog inserta i PCR analizu rekombinantnih bakterijskih kolonija	310 - 332 428 - 405

MSC; mjesto za višestruko kloniranje.



Slika 4. Mapa plazmidnog vektora pcDNA™3.1/HisC (A) i detaljan prikaz mjesta za višestruko kloniranje (MCS) (B). Crvenom bojom označena su mjesta cijepanja restrikcijskih enzima, a zelenom biljezi za praćenje uspješnosti transfekcije stanica HEK293.

Tablica 11. Genetski elementi plazmidnog vektora pcDNA^{TM}3.1/HisC

ELEMENT	FUNKCIJA	MJESTO (pb)
P_{CMV}	Promotor za ljudski citomegalovirus (CMV) omogućava visoku ekspresiju rekombinantnog proteina	209-863
Slijed nukleotida ATG	Mjesto početka translacije	920-922
N-terminalni polihistidinski marker 6xHis	Omogućava pročišćavanje rekombinantnog proteina na metal-helatorskim smolama (*ProBond*^{TM})	2782-1922
N-terminalni epitopni marker Xpress^{TM}	Omogućava detekciju rekombinantnog proteina pomoću protutijela *Anti-Xpress*^{TM}	989-1012
Enterokinazno mjesto cijepanja (engl. *enetrokinase cleavage site*, EK)	Omogućava uklanjanje 6xHis markera pomoću enterokinaza EKMax^{TM}	998-1012
MSC	Omogućava spajanje i izrezivanje inserta	1012-1085
Poliadenilacijski signal BGH	Omogućava završetak transkripcije i poliadenilaciju mRNA	1104-1318
SV40 promotor	Omogućava efikasnu i visoku ekspresiju gena za otpornost na neomicin i episomalnu replikaciju u stanicama koje eksprimiraju SV40 veliki T-antigen	1859-2183
Gen za otpornost na neomicin	Omogućava selekciju stabilno transfeciranih stanica sisavaca	2219-3013
SV40 poliadenilacijski signal	Omogućava završetak transkripcije i poliadenilaciju mRNA	3029-3288
pUC ishodište replikacije	Omogućava veliki broj kopija plazmida u bakterijskim stanicama *E. coli*	3700-4373
Gen za β-laktamazu	Omogućava otpornost na ampicilin i pozitivnu selekciju rekombinantnih bakterija	4518-5379

MSC, mjesto za višestruko kloniranje.

3.2.4.2. *Umnažanje cjelovite cDNA za rCfex*

Iz bubrega štakora izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA kao što je opisano u poglavljima 3.2.3.1. - 3.2.3.4., a cjelovita cDNA za *rCfex* umnožena je tijekom reakcije PCR. Kako bi se omogućilo umnažanje cjelovite cDNA za *rCfex,* upotrijebljen je par početnica (F2 i R2) (**Tablica 9**) čijim umnažanjem nastaje produkt reakcije PCR veličine ~2,2 kb. Reakcijska smjesa za PCR u ukupnom volumenu od 20 µL sadržavala je cDNA, par specifičnih oligonukleotidnih početnica za *rCfex* (F2 i R2), dNTP mješavinu i DNA polimerazu *Phusion High-Fidelity* s odgovarajućim puferom (**Tablica 12**). Također, u reakciji PCR korištena je negativna kontrola NTC koja je sadržavala sve sastojke reakcijske smjese za PCR, osim kalupa (cDNA). Reakcija PCR odvijala se u uređaju za PCR T100 *Thermal Cycler* tijekom 34 ciklusa prema uvjetima navedenim u **Tablici 13**.

Tablica 12. Reakcijska smjesa za umnažanje cjelovite cDNA za *rCfex* (klasični PCR)

Sastojci smjese za PCR	Radna otopina	Konačna koncentracija	Konačni volumen (µL)
cDNA	0,1 µg/µL	50 ng	0,5
Pufer za DNA polimerazu *Phusion High-Fidelity*	5x	1x	4
Smjesa dNTP	10 mM	200 µM	0,4
Početnica F2	20 µM	0,5 µM	0,5
Početnica R2	20 µM	0,5 µM	0,5
DNA polimeraza *Phusion High-Fidelity	2 U/µL	0,02 U/µL	0,2
deH_2O bez nukleaza	-	-	13,9
Ukupni volumen	-	-	20

*DNA polimeraza *Phusion High-Fidelity* je enzim s 5′→3′ DNA polimeraznom aktivnošću i 3′→5′ egzonukleaznom aktivnošću te omogućava vjerno umnažanje velikih nukleotidnih sljedova (genomska DNA do 7,5 kb) te se stoga rabi tijekom molekularnog kloniranja.

Tablica 13. Uvjeti reakcije za umnažanje cjelovite cDNA za *rCfex* (klasični PCR)

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija DNA	98°C	30 s
Denaturacija DNA	98°C	10 s
Sparivanje početnica	66°C	30 s
Produljivanje lanca DNA	72°C	60 s
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	10 min

3.2.4.3. *Izdvajanje i pročišćavanje produkata reakcije PCR iz agaroznog gela*

Produkti reakcije PCR razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu s etidij bromidom, a njihova veličina utvrđena je usporedbom s odgovarajućim DNA biljezima. Priprema gela, elektroforeza, slikanje gelova i obrada fotografija opisani su u poglavlju 3.2.3.3. Dio gela koji sadrži željene odsječke DNA izrezan je pod UV svjetlom skalpelom i zagrijavan u odgovarajućem puferu u svrhu otapanja agaroze. Otopljena agaroza s odabranim odsječcima DNA pročišćena je pomoću kompleta reagensa *MinElute Gel Extraction Kit* prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na selektivnom vezanju DNA na kolonu, a vezana DNA eluira se pomoću deH_2O bez nukleaza. Izdvojeni i pročišćeni odsječci DNA pohranjeni su pri -20°C do upotrebe.

3.2.4.4. *Određivanje koncentracije DNA*

Koncentracija DNA izmjerena je upotrebom spektrofotometra Biospec-nano mjerenjem OD pri valnoj duljini od 260 nm, a čistoća je određena mjerenjem OD pri valnim duljinama od 230, 260 i 280 nm, te procijenjena računanjem dvaju omjera: OD_{260}/OD_{280} i OD_{260}/OD_{230}.

3.2.4.5. *Ligacija cjelovite cDNA za rCfex i plazmida pJET1.2/blunt*

Spajanje inserta i vektora s tupim krajevima (engl. *blunt ends*) provedeno je pomoću kompleta reagensa *CloneJet PCR Cloning Kit* prema uputama proizvođača. Kao insert upotrijebljena je cjelovita cDNA za *rCfex* koja je umnožena i pročišćena postupcima opisanim u poglavljima 3.2.4.2. – 3.2.4.4., a kao vektor upotrijebljen je linearni plazmid pJET1.2/blunt (**Slika 3, Tablica 10**). Reakcijska smjesa za ligaciju u ukupnom volumenu od 20 µL sadržavala je cjelovitu cDNA za *rCfex* veličine ~2,2 kb (insert), plazmid pJET1.2/blunt (vektor) i enzim T4 DNA ligazu s odgovarajućim puferom (**Tablica 14**). Reakcija ligacije odvijala se u termobloku *Thermomixer Comfort* pri 22°C tijekom 20 min. Novonastali rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* korišten je za transformaciju bakterijskih stanica *E. coli*.

Tablica 14. Reakcijska smjesa za ligaciju

Sastojci smjese za ligaciju	**Volumen**
Pufer za T4 DNA ligazu; 2x	10 µL
Insert: cjelovita cDNA za *rCfex;* 8,56 ng/µL	8 µL
Plazmidni vektor: pJET1.2/blunt; 50 ng/µL	0,5 µL
deH_2O bez nukleaza	1 µL
T4 DNA ligaza; 5 U/µL	0,5 µL
Ukupni volumen	20 µL

3.2.4.6. *Transformacija bakterijskih stanica rekombinantim plazmidima*

Kompetentne bakterijske stanice *E. coli* soja DH5α prethodno su pripremljene prema uputama protokola za molekularnu biologiju (Sambrook i sur., 1989.), a potom transformirane konstruiranim rekombinantnim plazmidima. Transformacija je provedena temperaturnim šokom (engl. *heat shock*) koji mijenja propusnost membrane i pospješuje ulazak plazmida u stanicu. U 25 μL bakterijskih stanica dodano je 2,5 μL rekombinantnog plazmida. Smjesa je prvotno inkubirana pri 4^{o}C tijekom 30 min, zatim pri 42°C tijekom 20 s i konačno ohlađena pri 4^{o}C tijekom 2 min. Transformirane bakterijske stanice su potom inkubirane u 475 μL tekućeg hranjivog LB medija pri 37°C tijekom 1 h uz miješanje, te nacijepljene na selektivnu krutu hranjivu LB podlogu s dodatkom antibiotika ampicilina (100 μg/mL). Uzgoj bakterija se provodio u standardnim uvjetima kako je opisano u sljedećem poglavlju.

3.2.4.7. *Uzgoj bakterijskih kultura*

Uzgoj bakterijskih kultura na krutoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici izvodi se nacjepljivanjem bakterija iz smrznute ili tekuće kulture razmazivanjem sterilnim metalnim štapićem, nakon čega slijedi inkubacija tijekom noći pri 37°C u termostatu pri čemu nastaju okom vidljive kolonije. Uzgoj u tekućoj hranjivoj podlozi izvodi se nacjepljivanjem pojedinačne kolonije s krute podloge ili iz tekuće bakterijske kulture. Inkubacija se provodi na 37°C na rotacijskoj platformi-tresilici, uz miješanje pri 250 okretaja/minuti.

3.2.4.8. *PCR na bakterijskim kolonijama*

U reakcijskoj smjesi za PCR, kao kalup je korišten uzorak bakterijske kolonije izrasle na selektivnoj krutoj LB podlozi kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.7. Reakcijska smjesa za PCR u ukupnom volumenu od 20 μL sadržavala je DNA polimerazu *AmpliTaq*® s odgovarajućim puferom, smjesu dNTP i specifične parove oligonukleotidnih početnica (**Tablica 15**).

Tablica 15. Sastojci reakcijske smjese za PCR na bakterijskim kolonijama

Sastojci smjese	Volumen
Pufer za DNA polimerazu *AmpliTaq*®; 10x	2 µL
Smjesa dNTP; 10 mM	0,4 µL
DNA polimeraza *AmpliTaq*®; 5 U/µL	0,08 µL
$MgCl_2$; 25 mM	2 µL
cDNA: bakterijska kolonija	*uzorak bakterijske kolonije
Početnica F; 10 µM	0,4 µL
Početnica R; 10 µM	0,4 µL
deH_2O bez nukleaza	14,32 µL
Ukupni volumen	20 µL

***Uzorak bakterijske kolonije je pomoću vrha nastavka za pipetu uronjen u pripremljenu reakcijsku smjesu za PCR.

Kako bi se umnožila cjelovita cDNA za *rCfex* od ~2,2 kb (insert), rabljena su dva para početnica koje omeđuju MCS plazmidnih vektora; za pJET1.2/blunt (pJET1.2/blunt F i pJET1.2/blunt R**)** i za pcDNA^{TM}3.1/HisC (pcDNA^{TM}3.1/HisC F i pcDNA^{TM}3.1/HisC F). Reakcija PCR odvijala se u uređaju za PCR *Biometra T Personal* tijekom 34 ciklusa pri uvjetima navedenim u **Tablici 16**. Svaka reakcija PCR uključivala je i NTC koja je sadržavala sve sastojke reakcijske smjese za PCR, osim kalupa (bakterijskih kolonija). Produkti reakcije PCR razdvajani su elektroforezom u gelu agaroze kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.6.

Tablica 16. Uvjeti reakcije PCR na bakterijskim kolonijama

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija DNA	94°C	2 min
Denaturacija DNA	94°C	30 s
Sparivanje početnica	57°C	30 s
Produljivanje lanca DNA	72°C	2 min i 20 s
Kraj reakcije	4°C	∞

3.2.4.9. *Umnažanje transformiranih bakterijskih kolonija i izdvajanje rekombinantne plazmidne DNA*

Bakterijske kolonije, za koje se prethodno opisanom metodom pokazalo da sadrže rekombinantne plazmide od interesa, nacijepljene su u tekuću LB podlogu s ampicilinom (100 µg/mL), uzgajane pri standardnim uvjetima (37°C tijekom 12-16 h u rotacijskoj tresilici na 225 okretaja/min) i potom je iz njih izdvojena plazmida DNA. Bakterijskim klonovima u suspenziji tekućeg LB medija, koji nisu korišteni za izdvajanje plazmida, dodan je glicerol u volumnom omjeru 4:1, te su tako čuvani pri -80°C. Postupak izdvajanja plazmidne DNA izveden je pomoću komercijalnog kompleta reagensa *QIAprep Spin Miniprep Kit* prema uputama proizvođača, a metoda se temelji na alkalnoj lizi bakterijskih stanica, te selektivnom vezanju plazmidne DNA na membranu kolone. Nakon ispiranja membrane, plazmidna DNA eluira se pomoću deH_2O bez nukleaza. Uspješnost izolacije plazmidne DNA analizirana je elektroforezom u agaroznom gelu, a koncentracija izdvojene plazmidne DNA izmjerena je spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.4. Uzorci izdvojene i pročišćene plazmidne DNA pohranjeni su pri -20°C do upotrebe. U svrhu potvrde uspješne transformacije bakterijskih stanica dvama različitim rekombinantnim plazmidima pcDNA^{TM}3.1/His, izdvojeni plazmidi su obrađeni kombinacijom restrikcijskih enzima *EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI* u uređaju za PCR *Biometra T Personal* (**Tablica 17**) prema uvjetima opisanim u **Tablici 18**. Produkti digestije su potom razdvojeni elektroforezom u agaroznom gelu. Izdvojeni i pročišćeni rekombinantni plazmidi pcDNA^{TM}3.1/HisC s ukloniranom cDNA za *rCfex* pohranjeni su pri -20°C do upotrebe.

Tablica 17. Sastojci za reakciju restrikcijskih enzima i plazmida pcDNA™ 3.1/HisC

Sastojci reakcije	EcoRI/ApaI	NheI/ApaI
deH$_2$O bez nukleaza	13,93 µL	14,06 µL
Pufer (engl. *Fast Digest Green*); 10x	2 µL	2 µL
Rekombinantni plazmid pcDNA™ 3.1/HisC; 1000 ng	2,07 µL	1,94 µL
Enzimi *EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI*	1 µL + 1 µL	1 µL + 1 µL
Ukupni volumen	20 µL	20 µL

Tablica 18. Uvjeti za reakciju restrikcijskih enzima i plazmida pcDNA™ 3.1/HisC

Enzimi	Temperatura	Vrijeme
EcoRI* + *ApaI **ili** ***NheI* + *ApaI***	37°C	10 min
	80°C	5 min

3.2.4.10. *Sekvenciranje kloniranog odsječka cjelovite cDNA za rCfex*

Odsječak cjelovite cDNA za *rCfex* (~2,2, kb), kloniran u plazmidni vektor pJET1.2/blunt, sekvenciran je upotrebom 6 različitih oligonuleotidnih početnica (**Tablica 9**). Svaka od šest reakcija za sekvenciranje sadržavala je specifičnu početnicu (3,2 pmol/µL) i rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt (300 ng DNA) u ukupnom volumenu od 14 µL. Sekvenciranje i sravnjivanje nukleotidnih sekvenci cjelovite cDNA za *rCfex* provedeno je u DNA servisu Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.7.

3.2.4.11. *Izrezivanje klonirane cDNA za rCfex iz rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt i spajanje s plazmidnim vektorom pcDNA™ 3.1/HisC*

Klonirana cjelovita cDNA za *rCfex* izrezana je iz rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt upotrebom dvije kombinacije restrikcijskih enzima (*EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI*) čija su mjesta konstruirana tijekom dizajniranja početnica za umnažanje cDNA gena *rCfex* (**Tablica 9**). Reakcija izrezivanja kloniranog inserta (cjelovita cDNA za *rCfex*) iz vektora (rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt) provedena je u reakcijskoj smjesi (**Tablica 19**) u uređaju za PCR *Biometra T Persona* pri uvjetima prikazanim u **Tablici 20.**

Tablica 19. Reakcijska smjesa za izrezivanje klonirane cDNA za *rCex* iz rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt

Sastojci smjese	Volumen
deH_2O bez nukleaza	9,59 µL
Pufer *Fast Digest*; 10x	2 µL
Rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt; 156,42 ng/µL (1000 ng)	6,41 µL
Restrikcijski enzimi (*NheI/ApaI* ili *EcoRI/ApaI*)	1 µL + 1 µL
Ukupni volumen	20 µL

Tablica 20. Uvjeti reakcije izrezivanja klonirane cDNA za *rCex* iz rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt

Enzimi	Temperatura	Vrijeme
1) EcoRI* ili *NheI	37°C	15 min
	80°C	5 min
2) ApaI	37°C	15 min
	80°C	5 min

Nakon reakcije izrezivanja, provedena je elektroforeza DNA u gelu agaroze, a cjelovita cDNA za *rCfex* (veličine ~2,2 kb) pročišćena je kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.3. Plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC inkubiran je s restrikcijskim enzimima (*EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI*) i defosfatazom (**Tablica 21.**) kako bi se uklonile fosfatne skupine sa slobodnih krajeva plazmida, te olakšala ligacija inserta i vektora. Uvjeti enzimske reakcije koja se provela u uređaju za PCR *Biometra T Personal* navedeni su u **Tablici 22**.

Tablica 21. Sastojci reakcijske smjese za pripremu plazmida pcDNA^{TM} 3.1/HisC

Sastojci smjese	Volumen
deH_2O bez nukleaza	14,82 µL
Pufer *Fast Digest*; 10x	2 µL
Plazmid pcDNA^{TM} 3.1/HisC; 850 ng/µL (1000 ng)	1,18 µL
Restrikcijski enzimi (*NheI/ApaI* ili *EcoRI/ApaI*) ili defosfataza	1 µL + 1 µL
Ukupni volumen	20 µL

Tablica 22. Uvjeti reakcije za pripremu plazmida pcDNA^{TM} 3.1/HisC

Enzimi	Temperatura	Vrijeme
1) *Eco*RI ili *NheI*	37°C	15 min
	80°C	5 min
2) ApaI	37°C	15 min
	80°C	5 min
3) Defosfataza	37°C	10 min
	80°C	5 min

Nakon toga su produkti digestije razdvojeni elektroforezom DNA u gelu agaroze, a plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC je pročišćen kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.3. Koncentracije i čistoća inserta (cjelovita cDNA za *rCfex*) i vektora (plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC) izmjerene su spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.4. Ligacija cjelovite cDNA za *rCfex* (insert) i plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC (vektor) provedena je u dvije reakcijske smjese ovisno o rabljenim restrikcijskim enzimima (*EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI*). Obje reakcijske smjese za ligaciju u ukupnom volumenu od 20 µL sadržavale su plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC, cDNA za

rCfex i enzim T4 DNA ligazu s pripadajućim puferom (**Tablica 23**), pri čemu je omjer volumena inserta i plazmida u reakcijskoj smjesi izračunat prema formuli:

$$masa(insert) = 3 \times \frac{veličina\ insert\ cDNA\ za\ rCfex}{veličina\ vektor\ pcDNA\ TM3.1/HisC\ (plazmid)} \times 50\ ng$$

Reakcija ligacije odvijala se pri 22°C tijekom 10 min, a prekinuta je naglim snižavanjem temperature na ledu tijekom 5 min (**Tablica 24**).

Tablica 23. Reakcijska smjesa za ligaciju cjelovite cDNA za *rCfex* i plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC

Sastojci smjese za ligaciju	*EcoRI/ApaI*	*NheI/ApaI*
Pufer za DNA ligazu T4; 2x	2 µL	2 µL
Insert: cDNA za r*Cfex* DNA; 60 ng	2,82 µL	4,16 µL
Vektor: plazmid pcDNA^{TM} 3.1/HisC; 50 ng	0,81 µL	0,76 µL
deH_2O bez nukleaza	14,04 µL	12,75 µL
DNA Ligaza T4; 5 U/µL	0,33 µL	0,33 µL
Ukupni volumen	20 µL	20 µL

Tablica 24. Uvjeti reakcije za ligaciju cjelovite cDNA za *rCfex* i plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC

Sastojci reakcijske smjese	Temperatura	Vrijeme
1) EcoRI/ApaI **ili** ***2) NheI/ApaI***	22°C	10 min
	4°C	5 min

3.2.4.12. *Transfekcija stanica HEK293*

Stanice stanične linije HEK293 uzgajane su u mediju DMEM uz dodatak 10 % FBS u inkubatoru pri 37°C u atmosferi uz 5 % CO_2 i 100 % vlažnosti prema uputama ATCC (engl. *American Type Culture Collection*). Stanice su nasađene na kružna pokrovna stakalca uronjena u CitoOne® pločice s 24 jažice do postizanja subkonfluentnog sloja. Uoči postupka transfekcije, hranjivi medij DMEM s 10% FBS zamijenjen je sa čistim hranjivim medijem DMEM jer prisutnost FBS-a bitno umanjuje efikasnost transfekcije s PEI. Upotrebom PEI (0,75 μg/jažici), stanice su prolazno transfecirane s: 1) plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji nema ukloniranu cDNA za *rCfex* (kontrolni plazmid - negativna kontrola), 2) rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cDNA za *rCfex* (*NheI/ApaI*) i 3) rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji uz cDNA za *rCfex* sadrži poliHis i Xpress biljege (*EcoRI/ApaI*). Transfekcijska smjesa PEI i plazmida pripremljena je u masenom omjeru 1:1 (0,75 μg/jažici) u ukupnom volumenu od 50 μL. Prolazna transfekcija stanica HEK293 provedena je u inkubatoru pri 37°C u atmosferi uz 5 % CO_2 i 100 % vlažnosti tijekom 4 h. Nakon inkubacije, transfekcijska smjesa je odstranjena i zamijenjena s 500 μL hranjivog medija DMEM koji sadrži 10% FBS. Stanice su potom inkubirane pri 37°C u atmosferi s 5 % CO_2 i 100 % vlažnosti tijekom 18-24 h prije pripreme za imunocitokemijsku analizu. Svi postupci koji su uključivali nasađivanje stanica, zamjenu hranjivog medija i postupak transfekcije provedeni su u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima.

3.2.5. Određivanje ekspresije proteina rCfex

3.2.5.1. *Izdvajanje ukupnih staničnih membrana*

Ukupne stanične membrane (engl. *Total Cell Membrane*, TCM) izdvojene su metodom diferencijalnog centrifugiranja iz bubrega, različitih dijelova tankog crijeva, jetre i gušterače. Nakon žrtvovanja, uzorci tkiva isprani su u hladnom puferu PBS i uronjeni u hladni homogenizirajući pufer s inhibitornima proteaza: 1 mM PMSF (50 μL/10 mL pufera) i 1 tableta/100 mL pufera. Potom su homogenizirani na ledu električnim homogenizatorom *Powergen* 125 (1 min homogenizacije, 2 min pauza, 1 min homogenizacije) na maksimalnoj brzini. Dobiveni 10 % homogenati su centrifugirani (5000 x g/15 min/4°C) pomoću centrifuge *Sorvall RC2B* kako bi se istaložile cijele stanice, jezgre i nerazgrađeni tkivni matriks. Nastali talog je bačen, a supernatant centrifugiran (150000 x g/60 min/4°C) pomoću

ultracentrifuge *Sorvall OTD-Combi*. Dobiveni talog sa TCM otopljen je u 100-200 μL homogenizirajućeg pufera razrijeđenog s deH_2O u omjeru 1:1. Uzorci TCM pohranjeni su pri -20°C do korištenja.

3.2.5.2. *Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu*

Koncentracija proteina u TCM izmjerena je spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (Bradford, 1976.) pomoću spektrofotometra CECIL 9000 (Cambridge, Velika Britanija) pri valnoj duljini od 595 nm. Standardna krivulja (odnos OD i koncentracije proteina) dobivena je mjerenjem OD uzoraka serijskih razrjeđenja BSA poznate koncentracije u rasponu od 0,2 do 1,2 mg/mL. Prije mjerenja, uzorci TCM razrijeđeni su tako da je izmjerena OD bila u linearnom rasponu baždarnog pravca. Na temelju baždarnog pravca i izmjerene OD, određene su koncentracije proteina u uzorcima TCM. Slijepa proba je, osim uzoraka TCM, sadržavala sve sastojke korištene za pripremu uzoraka.

3.2.5.3.*SDS-elektroforeza proteina u gelu poliakrilamida (SDS-PAGE) i western analiza*

Denaturirajuća elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) korištena je za razdvajanje proteina u uzorcima TCM. Uzorci TCM denaturirani su u Laemmli puferu u omjeru 2:1 zagrijavanjem pri 37°C/30 min, 65°C/15 min ili 95°C/5 min uz prisustvo ili odsustvo reducirajućeg agensa β-merkaptoetanola (β-ME, 3-5%) tako da je konačna koncentracija proteina u svim uzorcima bila 4 μg/μL. Tako pripremljeni uzorci pohranjeni su pri -20°C do korištenja. U stalak za izlijevanje gelova prvo je izliven donji 10 % poliakrilamidni gel za razdvajanje čiju je polimerizaciju osiguralo dodavanje sloja izopropanola. Po završetku polimerizacije izopropanol je uklonjen, a površina gela isprana s deH_2O. Zatim je izliven gornji 4 % poliakrilamidni gel za sabijanje u kojeg su uronjeni češljevi za formiranje jažica. Polimerizacije gelova se odvijala pri sobnoj temperaturi (~30 min/gelu). Nakon polimerizacije gornjeg gela, češljevi za jažice su uklonjeni, a jažice isprane s deH_2O. **Tablica 25** prikazuje sastojke smjese za pripravu poliakrilamidnih gelova. Proteini u TCM su elektroforetski razdvojeni u puferu za elektroforezu pri naponu od 100 V u sustavu za vertikalnu elektroforezu proteina *Mini Protean III Cell*. Elektroforeza je zaustavljena nakon što je bromfenol plava boja dosegla dno gela (~2 h). Neposredno prije prijenosa razdvojenih proteina na membranu, hidrofobne najlonske Immobilon PVDF (engl.

Polyvinylidene fluoride - polivinilidenski fluorid) membrane isprane su u metanolu (~10 s) i uronjene u pufer za prijenos (~15 min). Prijenos razdvojenih proteina provodio se u puferu za prijenos pri stalnom naponu od 100 V tijekom 2 h u sustavu za prijenos proteina *Mini Trans-Blot Cell*. Uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu provjerena je inkubacijom membrana u otopini boje Coomassie blue (~10 s). Nakon toga su membrane isprane u otopini za odbojavanje i deH_2O te inkubirane u puferu za blokiranje pri sobnoj temperaturi (4 x 10 min).

Tablica 25. Smjesa za pripremu poliakrilamidnih gelova

	10% gel za razdvajanje	**4% gel za sabijanje**
Sastojci smjese	**Volumen**	**Volumen**
Akrilamid/Bisakrilamid	3 mL	0,52 mL
Tris-HCl	2,25 mL (pH 8,8)	1 mL (pH 6,8)
10% SDS	90 µL	40 µL
H_2O	3,21 mL	2,2 mL
14% APS	450 µL	240 µL
TEMED	2,4 µL	1,6 µL
Ukupni volumen	9 mL	4 mL

APS, amonijev persulfat; SDS, natrij-dodecil sulfat; TEMED, N,N,N',N' tetrametil-etan 1,2 diamin; Tris, (tris(hidroksimetil) aminometan).

Potom su inkubirane s primarnim protutijelima (CFEX-Ab ili aktin-Ab) tijekom 18 h pri 4°C, isprane u puferu za blokiranje na sobnoj temperaturi (4 x 10 min) i inkubirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelima (RAG-AP ili GAM-AP) tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Sve inkubacije membrana provedene su uz stalno miješanje. Sva protutijela razrijeđena su u puferu za blokiranje na sljedeći način: CFEX-Ab (1:250), aktin-Ab (1:1000), RAG-AP (1:500) i GAM-AP (1:1000). Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelima, membrane su isprane u puferu za blokiranje (4 x 10 min), puferu PBS (2 x 5 min) i puferu Tris (5 min), te inkubirane u detekcijskoj otopini BCIP/NBT pri čemu nastaje tamno-ljubičasto obojenje koje omogućuje vizualizaciju proteina. Upotrebom proteinskog biljega poznatih molekulskih masa određena je relativna molekulska masa (engl. *relative molecular mass*, Mr) proteina rCfex. Membrane su skenirane, a jačina bojanja proteinskih pruga izmjerena je pomoću računalnog programa ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/). Prikupljeni

podaci o jačini bojanja, tj. gustoći pojedinih proteinskih pruga su prikazani kao relativne vrijednosti u odnosu na izmjerenu gustoću najjače pruge (=1) iz skupine uzoraka s najvećim vrijednostima mjerenja.

3.2.6. Određivanje stanične lokalizacija proteina rCfex

3.2.6.1. *Fiksacija i rezanje tkiva kriomikrotomom*

Nakon žrtvovanja, uzorci različitih organa i tkiva isprani su u hladnom puferu PBS i fiksirani u 4 % otopini paraformaldehida tijekom 24 h pri 4°C. Potom su isprani u puferu PBS (3 x 20 min) i pohranjeni u puferu PBS s 0,02 % NaN_3 pri 4°C do korištenja. Fiksirani uzorci tkiva su inkubirani u 30 % saharozi tijekom noći, uklopljeni u polimerni medij *Compound* 4583 O.C.T., smrznuti i rezani pri -25°C u kriomikrotomu *Leica CM 1580* na nareske debljine 4 μm. Naresci su zalijepljeni na predmetna stakalca Superfrost/Plus i osušeni na sobnoj temperaturi tijekom 2-3 h, te pohranjeni pri 4°C do korištenja.

3.2.6.2. *Fiksacija transfeciranih stanica HEK293*

Transfecirane stanice HEK293 fiksirane su s 4 % paraformaldehidom tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi, isprane u puferu PBS (3 x 30 min) i pohranjene u puferu PBS s 0,02 % NaN_3 pri 4°C do korištenja.

3.2.6.3. *Imunofluorescencijska analiza*

U svrhu otkrivanja epitopa, tj. specifičnih veznih mjesta koje prepoznaje protutijelo, primijenjeni su različiti protokoli otkrivanja antigena (engl. *antigen retrieval*) koji su uključivali upotrebu alkohola, deterdženata i zagrijavanje pri visokim temperaturama u citratnom puferu različitih pH (Balen i sur., 2008.; Breljak i sur., 2010., 2013.; Brzica i sur., 2011.; Ljubojević i sur., 2007.; Sabolić i sur., 2006., 2012.; Vrhovac i sur., 2015.) Za sva istraživana tkiva, organe i stanice HEK293 utvrđen je optimalan protokol otkrivanja antigena. Tako su tkivni naresci kuhani u citratnom puferu pH 6 (mikrovalna pećnica: 4 x 5 min, 800 W), dok su stanice HEK293 kuhane u citratnom puferu pH 6 tijekom 5 minuta pri snazi od 800 W. Potom su uzorci hlađeni 20 min, isprani u PBS puferu (3 x 5 min), inkubirani s deterdžentima (15 min u 0,5 % Triton-X-100; 30 min u 2 % Triton-X-100) te isprani u PBS puferu (5 min). Nespecifično vezanje protutijela spriječeno je inkubacijom s 1 % BSA

tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim inkubirani s primarnim protutijelima tijekom ~18 h pri 4°C, isprani u 0,1% Triton-X-100 (10 min) i PBS puferu (2 x 5 min) te inkubirani sa odgovarajućim sekundarnim protutijelima tijekom 1 h pri sobnoj temperaturi. Sva protutijela razrijeđena su u puferu PBS s 0,02 % NaN_3. Razrjeđenja primarnih protutijela bila su: 1:100 (CFEX-Ab), 1:100 (Na/K-ATPaza-Ab) i 1:100 (6xHis-Ab). Razrjeđenja sekundarnih protutijela bila su: 1:400 (DAG-CY3) i 1:100 (GAM-FITC). Nakon ispiranja u 0,1 % Triton-X-100 (10 min) i puferu PBS (2 x 5 min), tkivni naresci su prekriveni otopinom za očuvanje fluorescencije *Vectashield* i pokrovnim stakalcem, analizirani fluorescencijskim mikroskopom OPTON III RS, te snimljeni digitalnom kamerom SPOT RT povezanom s mikroskopom. Također, stanice HEK293 analizirane su upotrebom konfokalnog laserskog mikroskopa *Leica TCS SP2 AOBS* u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu. Za blokiranje vezanja komercijalno dostupnog protutijela CFEX-Ab za epitop proteina od interesa (protein rCfex) korišten je komercijalni imunizacijski peptid nepoznatog slijeda nukleotida (sc-2678 P). Protutijelo i imunizacijski peptid su prije upotrebe u imunofluorescencijskoj analizi pomiješani u omjeru 1:2 (= CFEX-Ab : P) i inkubirani pri sobnoj temperaturi tijekom 3 h. Prilikom izvođenja dvostrukog bojanja (engl. *double labelling*), tkivni naresci su prvo inkubirani jednim primarnim i odgovarajućim sekundarnim protutijelom, isprani u 0,1 % Triton-X-100 (10 min) i puferu PBS (2 x 5 min), te inkubirani drugim primarnim i odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Sve snimljene fotografije obrađene su računalnim programom Adobe Photoshop 6.0. Kod tkivnih narezaka s dvostrukim bojanjem, tj. prisutnosti zelene i crvene fluorescencije na istom preparatu, slike su snimane pri dvije različite valne duljine korištenjem filtera svjetlosti koji propuštaju zelenu i crvenu valnu duljinu. Slike su potom preklopljene (engl. *merge*) pomoću računalnog programa Adobe Photoshop 6.0. Intenzitet, tj. jačina bojanja četkastih membrana proksimalnih kanalića bubrega izmjerena je pomoću računalnog programa ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/). Izmjerena jačina fluorescencije specifičnog obojenja umanjena je za izmjerenu jačinu fluorescencije pozadine preparata (engl. *background*) koja je mjerena u području specifičnog obojenja. Rezultati su prikazani kao relativne vrijednosti imunofluorescencije u odnosu na izmjereni intenzitet najjače obojanog specifičnog signala (=1) u setu uspoređivanih preparata.

3.2.7. Prikaz i statistička obrada rezultata

Rezultati elektroforetske analize nukleinskih kiselina fotografirani su digitalnim fotoaparatom. Rezultati western analize su skenirani, a rezultati imunoflourescencijske analize fotografirani digitalnom kamerom povezanom s fluorescencijskim mikroskopom. Dobivene fotografije i skenovi su potom obrađeni računalnim programom Adobe Photoshop 6.0. Za statističku analizu podataka korišteni su Student t-test i ANOVA/Duncan test unutar računalnog programa STATISTICA12 (StatSoft, SAD), a razina vjerodostojnosti postavljena je na $p<0,05$.

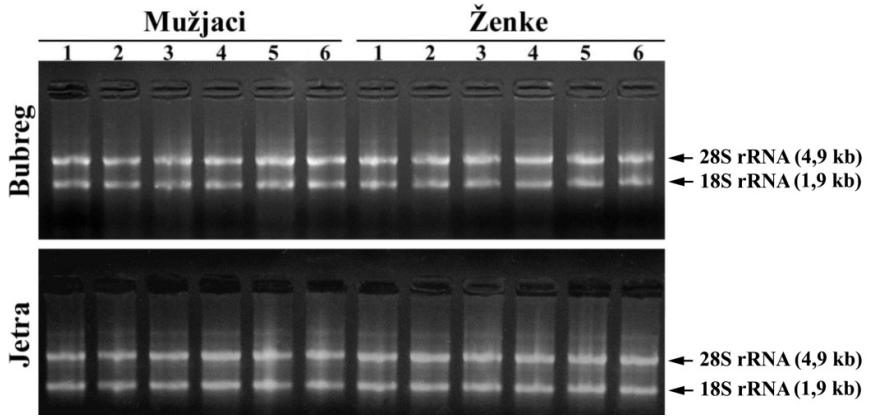
4. REZULTATI

4.1. Ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim tkivima i organima štakora

Kako bi se odredila relativna ekspresija mRNA za *rCfex* u štakora, iz različitih tkiva i organa izdvojena je ukupna stanična RNA. Potom je metodom RT sintetizirana cDNA koja je poslužila kao kalup za umnažanje odsječaka cDNA za *rCfex* tijekom reakcije PCR (klasični PCR). U tu svrhu dizajnirane su oligonukleotidne početnice za umnažanje odsječka cDNA za *rCfex,* a njihova specifičnost je potvrđena sekvenciranjem umnoženih odsječka cDNA za *rCfex.*

4.1.1. Provjera čistoće i cjelovitosti izdvojene RNA

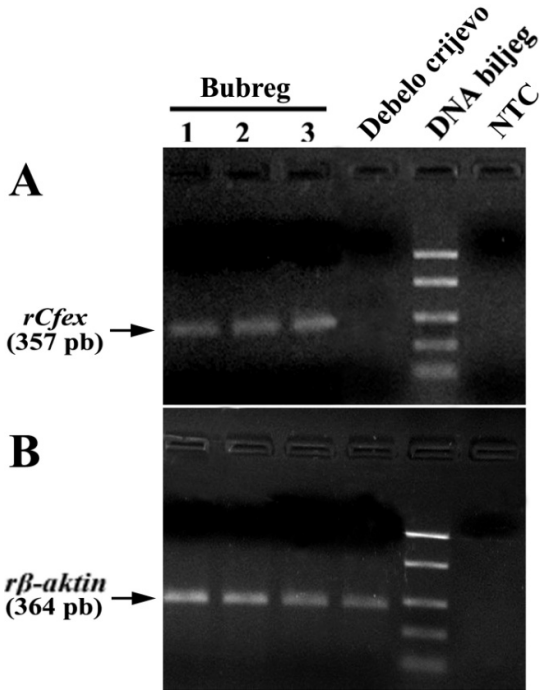
Ukupna stanična RNA izdvojena je iz različitih tkiva i organa otopinom *TRI*zola i pročišćena kompletom reagensa *RNeasy Mini Kit* kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.1. Koncentracija i čistoća izdvojenih RNA analizirana je spektrofotometrijski prema opisu u poglavlju 3.2.3.2., a dobiveni rezultati ukazali su na visoku čistoću izdvojenih RNA; omjer OD_{260}/OD_{280} iznosio je 1,8 – 2, a omjer OD_{260}/OD_{230} iznosio je 1,7 – 1,9. Cjelovitost izdvojenih RNA analizirana je elektroforezom RNA u 1% gelu agaroze prema opisu u poglavlju 3.2.3.3. Na **Slici 5** prikazani su rezultati elektroforetske analize izdvojenih RNA iz bubrega i jetre štakora oba spola koji ukazuju na cjelovitost izdvojenih RNA; na gelu se uočavaju dvije pruge ribosomske RNA (engl. *ribosomal RNA*, rRNA) od 4,9 kb (28S rRNA) i 1,9 kb (18S rRNA). Slični rezultati dobiveni su elektroforetskom analizom RNA koje su izdvojene iz ostalih organa štakora uključujući dijelove probavne cijevi (želudac, dvanaesnik, tašto crijevo, vito crijevo, slijepo crijevo i debelo crijevo) i gušteraču (rezultati nisu prikazani). Dakle, sve RNA izdvojene iz različitih organa i tkiva štakora oba spola (mužjaci, n=6; ženke n=6) bile su cjelovite i visoke čistoće, te stoga pogodne za daljnju RT-PCR analizu.



Slika 5. Analiza cjelovitosti izdvojene RNA. Iz bubrega i jetre štakora oba spola izdvojena je i pročišćena ukupna stanična RNA, a njena cjelovitost provjerena je elektroforezom u 1 % gelu agaroze. Dvije pruge ribosomske RNA (rRNA) od 4,9 kb (28S rRNA) i 1,9 kb (18S rRNA) upućuju na cjelovitost izdvojenih RNA.

4.1.2. Ekspresija mRNA za *rCfex* u bubrezima štakora; optimizacija metode RT-PCR

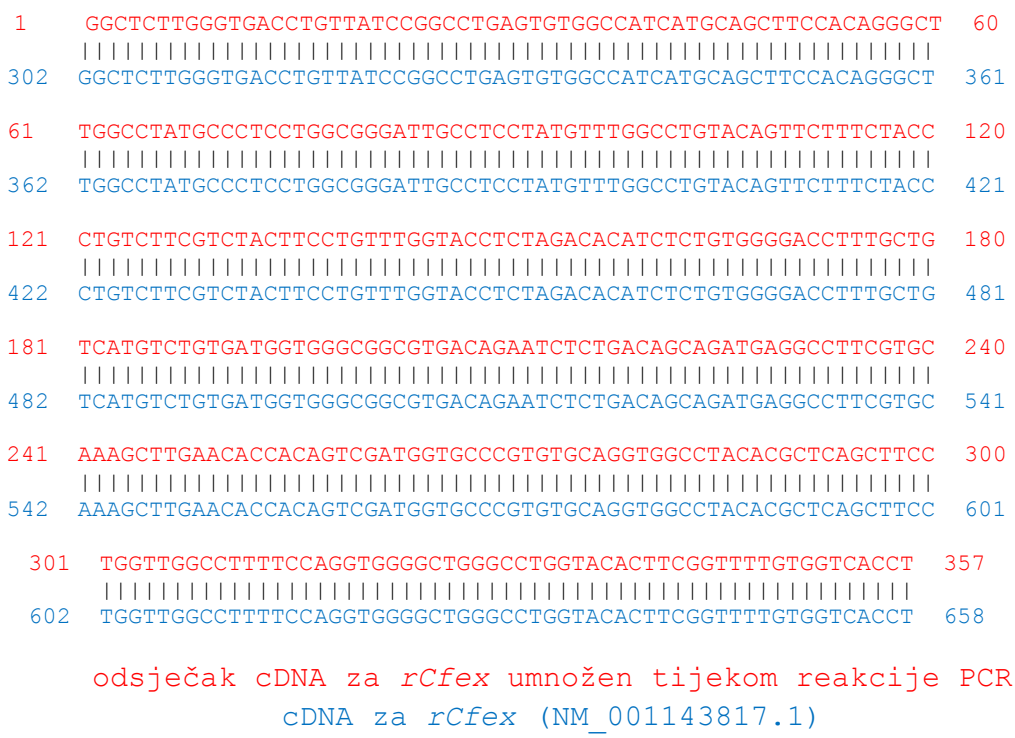
Kako bi se ispitala ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim organima i tkivima štakora, prvotno je optimizirana metoda klasičnog RT-PCR-a. Iz bubrega (pozitivna kontrola) i debelog crijeva (negativna kontrola) štakora izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA prema uputama u poglavljima 3.2.3.1. – 3.2.3.4. Tako sintetizirana cDNA poslužila je kao kalup za umnažanje odsječaka cDNA za *rCfex* tijekom reakcije PCR kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.5. U tu svrhu dizajnirane su oligonukleotidne početnice za umnažanje odsječaka cDNA za *rCfex* (**Tablica 8**). Kako bi se odredio optimalan broj ciklusa unutar eksponencijalne faze reakcije PCR, konstantna količina cDNA umnažana je pri različitom broju ciklusa reakcije PCR: 20, 25, 30, 35 i 40. Za kontrolu unosa količine cDNA praćena je ekspresija mRNA dvaju konstitutivno eksprimiranih gena: *rβ-aktin* ili *rHprt1*. Produkti reakcije PCR analizirani su u 1,5 % gelu agaroze prema opisu u poglavlju 3.2.3.6. Rezultati klasičnog RT-PCR-a pokazali su da se u bubrezima umnožio jedan odsječak cDNA za *rCfex* od 357 pb, dok u debelom crijevu štakora nije uočena ekspresija mRNA za *rCfex* tijekom 30 ciklusa (**Slika 6, jažice: 1-3**). Stoga su uzorci cDNA iz debelog crijeva štakora rabljeni kao negativna kontrola ekspresije mRNA za *rCfex* tijekom daljnje analize. U svim ispitanim uzorcima cDNA umnožio se jedan odsječak cDNA za *rβ-aktin* od 364 pb (25 ciklusa) čime je potvrđena uspješnost sinteze cDNA. U uzorcima NTC nisu se umnožili produkti reakcije PCR čime je potvrđeno da upotrebljavani reagensi nisu kontaminirani molekulama DNA.



Slika 6. **Ekspresija mRNA za *rCfex* u bubrezima štakora; klasični RT-PCR.** Iz bubrega (pozitivna kontrola) i debelog crijeva (negativna kontrola) štakora izdvojena je ukupna stanična RNA, reakcijom RT sintetizirana je cDNA koja je poslužila kao kalup za umnažanje odsječaka cDNA za *rCfex* tijekom reakcije PCR. Kao kontrola unosa količine cDNA praćena je ekspresija mRNA za *rß-aktin*. Produkti reakcije PCR analizirani su u 1,5 % gelu agaroze u prisustvu DNA biljega. **A.** U bubrezima štakora (n=3) su umnoženi odsječci cDNA za *rCfex* od 357 pb, dok u debelom crijevu nije uočena ekspresija mRNA za *rCfex* pri 30 ciklusa. **B.** U svim ispitanim uzorcima cDNA umnožen je odsječak cDNA za *rß-aktin* od 364 pb pri 25 ciklusa. U uzorcima NTC nisu se umnožili produkti reakcije PCR. NTC – *no template control*.

4.1.3. Sekvenciranje odsječka cDNA za *rCfex* umnoženog tijekom reakcije PCR

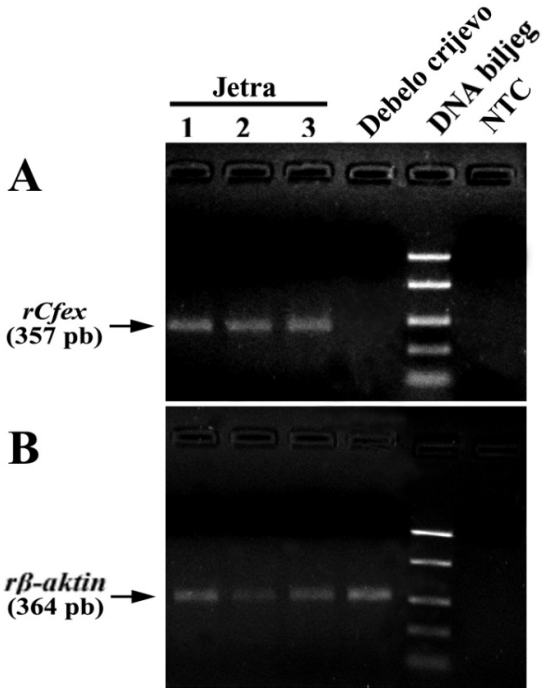
Kako bi potvrdili specifičnost upotrijebljenih oligonukleotidnih početnica za *rCfex*, metodom sekvenciranja utvrđena je primarna struktura, tj. slijed nukleotida odsječka cDNA za *rCfex* koji se umnožio tijekom reakcije PCR. Umnoženi odsječak cDNA za *rCfex* od 357 pb izrezan je iz gela (**Slika 6, jažice: 1-3**), pročišćen i sekvenciran s 5' i 3' krajeva kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.7. Sekvencirani odsječak cDNA za *rCfex* sravnjen je pomoću računalnog programa *Nucleotide BLAST (engl. Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool)* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) (**Slika 7**). Rezultat sravnjivanja je pokazao da je slijed nukleotida umnoženog odsječka cDNA za *rCfex* identičan slijedu nukleotida u cDNA *za rCfex* (NM_001143817.1) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Dakle, rezultati sekvenciranja su pokazali da se upotrebom para početnica za *rCfex* umnažaju specifični odsječci cDNA za *rCfex*. Shodno tome se uvjeti reakcije klasičnog RT-PCR-a (**Tablice 6 i 7**) i početnice za *rCfex* (**Tablica 8**) mogu rabiti za daljnja istraživanja ekspresije mRNA za *rCfex* u štakora metodom klasičnog RT-PCR-a.



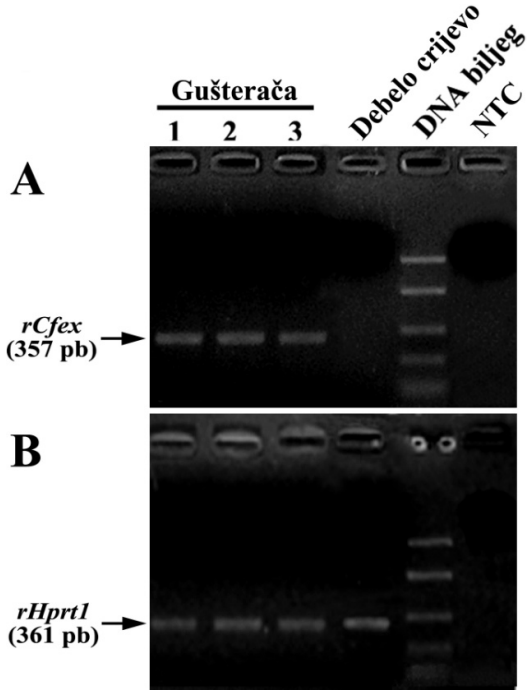
Slika 7. Sravnjivanje slijeda nukleotida umnoženog odsječka cDNA za *rCfex* i slijeda nukleotida cDNA za *rCfex* (NM_001143817.1). Iz bubrega štakora izdvojena je ukupna stanična RNA, sintetizirana cDNA, a umnoženi odsječak cDNA za *rCfex* od 357 pb je sekvenciran. Prikazan je rezultat sravnjivanja dva slijeda nukleotida: 1) sekvencirani odsječak cDNA za gen *rCfex*; 357 pb i 2) *rCfex* cDNA (NM_001143817.1); 2543 pb. Sravnjivanje je provedeno računalnim programom *Nucleotide BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Odsječak cDNA za gen *rCfex* koji je umnožen tijekom reakcije PCR u potpunosti (100%) je identičan cDNA za *rCfex* (NM_001143817.1). Izvor nukleotidnog slijeda za cDNA za *rCfex* je baza podataka NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

4.1.4. Ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim organima i tkivima štakora

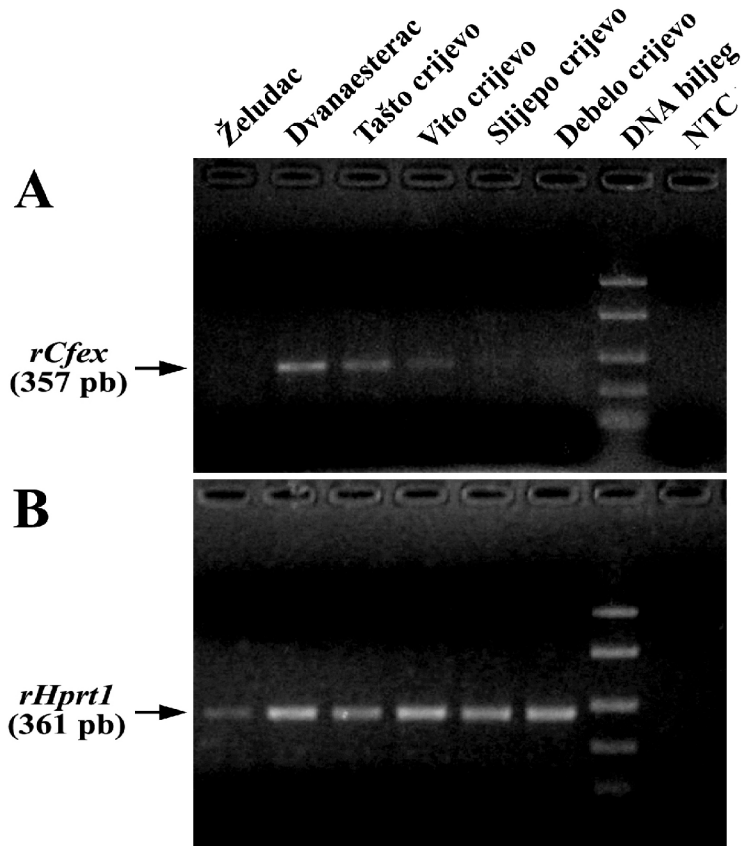
Nakon što je optimizirana reakcija RT-PCR i sekvenciranjem potvrđena specifičnost početnica za *rCfex*, ekspresija mRNA za *rCfex* ispitana je u različitim organima štakora kao što su jetra, gušterača, želudac, tanko crijevo (dvanaesnik, tašto i vito crijevo) i slijepo crijevo, pri čemu su uzorci debelog crijeva rabljeni kao negativna kontrola. U tu svrhu izdvojena je ukupna stanična RNA iz gore navedenih tkiva i organa, te sintetizirana cDNA prema opisima u poglavljima 3.2.3.1. – 3.2.3.4. Reakcijom klasičnog PCR-a umnažani su odsječci cDNA za *rCfex* i dva konstitutivno eksprimirana gena *rβ-aktin* ili *rHprt1* prema uvjetima navedenim u **Tablicama 6 – 8**. Optimalan broj ciklusa unutar eksponencijalne faze reakcije PCR potreban za umnažanje odsječaka cDNA za *rCfex* iznosio je 30, a za *rβ-aktin* i *rHprt1* iznosio je 25. Produkti reakcije PCR analizirani su u 1,5 % gelu agaroze prema opisu u poglavlju 3.2.3.6. Tako je ekspresija mRNA za *rCfex* utvrđena u jetri (**Slika 8A, jažice: 1-3**), gušterači (**Slika 9A, jažice: 1-3**) i tankom crijevu uključujući dvanaesnik, tašto i vito crijevo, dok ekspresija mRNA za *rCfex* nije uočena u želucu, slijepom i debelom crijevu (**Slika 10A**) štakora. Nadalje, uočeno je postojanje zonskih razlika u ekspresiji mRNA za *rCfex* u tankom crijevu štakora; ekspresija mRNA za *rCfex* je najjača u dvanaesniku, nešto slabija u taštom crijevu, a najslabija u vitom crijevu. U svim ispitanim uzorcima cDNA umnožio se odsječak cDNA gena za *rβ-aktin* ili *rHprt1* čime je potvrđena uspješnost sinteze cDNA (**Slike 8B, 9B, 10B**). Također, u svim uzorcima NTC nisu uočeni produkti reakcije PCR što sugerira da upotrjebljeni reagensi nisu bili zagađeni molekulama DNA (**Slike 8A i B, 9A i B, 10A i B; jažice: NTC**).



Slika 8. Ekspresija mRNA za *rCfex* u jetri štakora; klasični RT-PCR. Iz jetre i debelog crijeva (negativna kontrola) štakora izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA koja je poslužila kao kalup za umnažanje odsječka cDNA za *rCfex* tijekom reakcije PCR. Kao kontrola unosa količine cDNA praćena je ekspresija mRNA za *rβ-aktin*. Produkti reakcije PCR analizirani su u 1,5 % gelu agaroze u prisustvu DNA biljega. **A.** U jetri štakora (n=3) umnoženi su specifični odsječci cDNA za *rCfex* od 357 pb, dok u debelom crijevu nije uočena ekspresija mRNA za *rCfex* pri 30 ciklusa. **B.** U svim ispitanim uzorcima cDNA umnožen je odsječak cDNA za *rβ-aktin* od 364 pb pri 25 ciklusa. U uzorcima NTC nisu se umnožili produkti reakcije PCR. NTC – *no template control*.



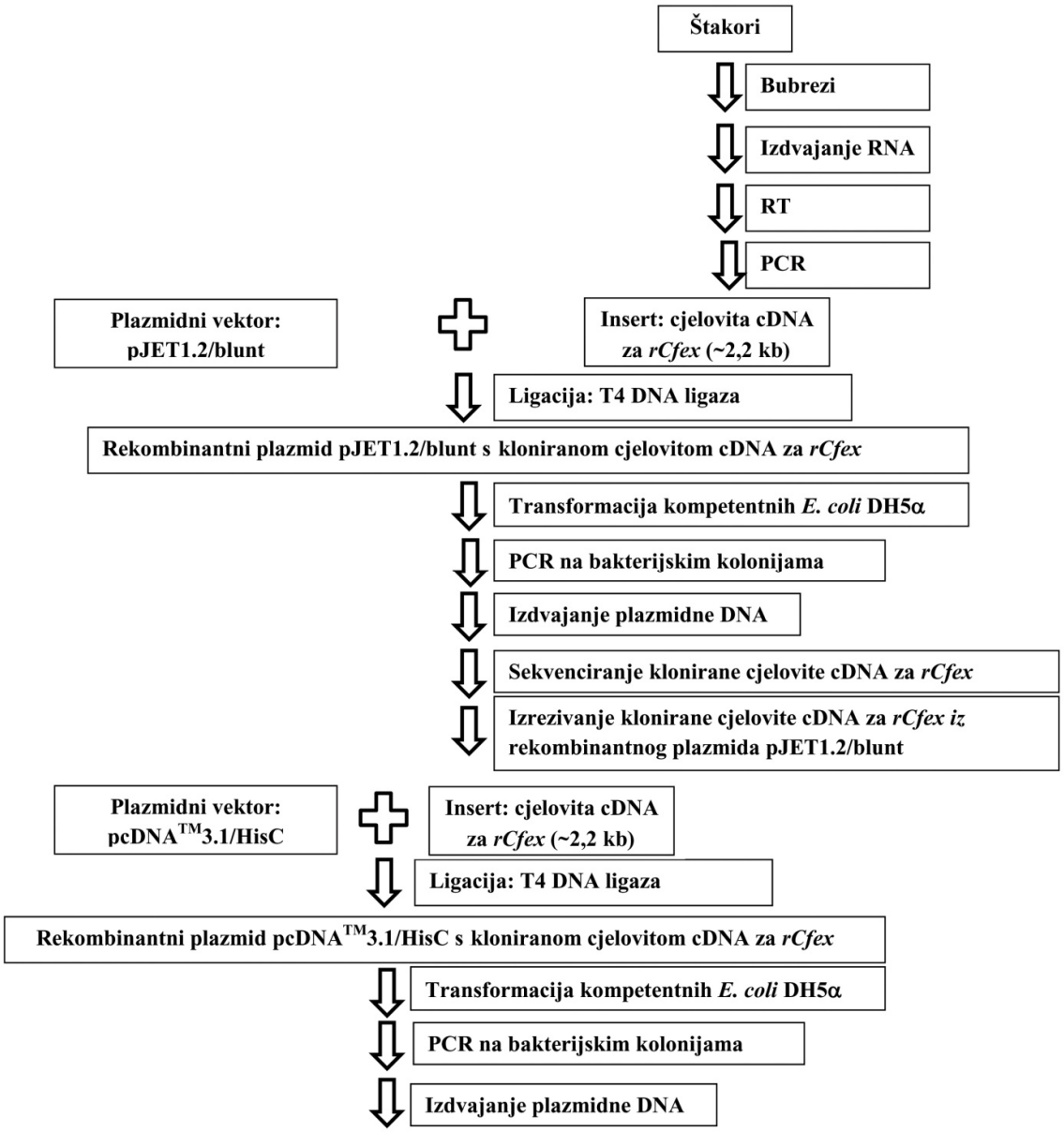
Slika 9. Ekspresija mRNA za *rCfex* u gušterači štakora; klasični RT-PCR. Iz gušterače i debelog crijeva (negativna kontrola) štakora izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA koja je poslužila kao kalup za umnažanje odsječka cDNA za *rCfex* tijekom reakcije PCR. Kao kontrola unosa količine cDNA praćena je ekspresija mRNA za *rHprt1*. Produkti reakcije PCR analizirani su u 1,5 % gelu agaroze u prisustvu DNA biljega. **A.** U gušterači štakora (n=3) umnoženi su specifični odsječci cDNA za *rCfex* od 357 pb, dok u debelom crijevu nije uočena ekspresija mRNA za *rCfex* pri 30 ciklusa. **B.** U svim ispitanim uzorcima cDNA umnožen je odsječak cDNA za *rHprt1* od 364 pb pri 25 ciklusa. U uzorcima NTC nisu se umnožili produkti reakcije PCR. NTC – *no template control*.



Slika 10. Ekspresija mRNA za *rCfex* duž probavne cijevi u štakora. Iz različitih dijelova probavne cijevi štakora (želudac, dvanaesnik, tašto crijevo, vito crijevo, slijepo crijevo i debelo crijevo) izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA koja je poslužila kao kalup za umnažanje odsječaka cDNA za *rCfex.* Kao kontrola unosa količine cDNA praćena je ekspresija mRNA za *rHprt1*. Produkti reakcije PCR analizirani su u 1,5 % gelu agaroze u prisustvu DNA biljega. **A.** Specifični odsječci cDNA za *rCfex* od 357 pb umnoženi su u tankom crijevu, upućujući na zonalne razlike u ekspresiji mRNA za *rCfex* (dvanaesnik > tašto crijevo > vito crijevo), dok ekspresija mRNA za *rCfex* nije detektirana u želucu, slijepom i debelom crijevu pri 30 ciklusa. **B.** U svim ispitanim uzorcima cDNA umnožen je odsječak cDNA za *rHprt1* od 364 pb pri 25 ciklusa. U uzorcima NTC nisu se umnožili produkti reakcije PCR. Slični rezultati RT-PCR analize dobiveni su u tkivima preostala dva mužjaka (nije prikazano). NTC – *no template control*.

4.2. Molekularno kloniranje gena *rCfex* i transfekcija stanica HEK293

Kako bi se ispitala stanična lokalizacija i ekspresija proteina rCfex u različitim tkivima i organima štakora, jedan od osnovnih preduvjeta je upotreba specifičnog protutijela tijekom western i imunofluorescencijske analize. Unatoč činjenici da sva dostupna protutijela pokazuju specifičnost *in silico*, na tržištu postoji mnoštvo protutijela koja mogu detektirati i nespecifične proteine. Prema pretraženim literaturnim podacima, specifičnost dostupnih komercijalnih protutijela za protein rCfex nije bila testirana. Stoga smo testirali specifičnost rabljenog protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab, sc26728) prije njegove upotrebe u imunokemijskim reakcijama western i imunofluorescencijske analize. U tu svrhu su stanice HEK293 prolazno transfecirane plazmidnim vektorima s kloniranom cjelovitom cDNA za gen *rCfex*. Gen *rCfex* kloniran je prema standardnoj proceduri (Sambrook i sur., 1989.) koja je shematski prikazana na **Slici 11**.



Slika 11. Shematski prikaz konstrukcije plazmidnih vektora s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*.

4.2.1. Konstrukcija rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt s kloniranom cjelovitom cDNA za rCfex

4.2.1.1. *Umnažanje cjelovite cDNA za rCfex*

Iz bubrega štakora izdvojena je ukupna stanična RNA, a reakcijom RT sintetizirana je cDNA kao što je opisano u poglavljima 3.2.3.1. – 3.2.3.4. Odsječak cjelovite cDNA za *rCfex* veličine 2,2 kb (NM_001143817.1), koji će biti kloniran u plazmidni vektor, umnožen je reakcijom PCR prema uvjetima prikazanim u **Tablicama 14 i 15**. Kako bi se omogućilo umnažanje cjelovite cDNA za *rCfex,* upotrijebljene su oligonukleotidne početnice komplementarne 5' i 3' krajevima cDNA za *rCfex* (**Tablica 11; početnice:** F2 i R2) koje na kalupu cDNA daju produkt veličine ~2,2 kb. Nadalje, za pripremu inserta za kloniranje, tj. cjelovite cDNA za *rCfex* upotrijebljena je DNA polimeraza *Phusion High-Fidelity* koja sintetizira produkte reakcije PCR s tupim krajevima (engl. *blunt ends*), a zbog svoje 3' → 5' egzonukleazne aktivnosti posjeduje veliku točnost umnažanja molekula DNA (engl. *high fidelity*). Produkti reakcije PCR razdvojeni su elektroforezom u gelu agaroze gdje su uočeni produkti veličine ~2,2 kb, a u uzorcima NTC nisu uočeni produkti reakcije PCR (rezultati nisu prikazani). Potom su produkti reakcije PCR veličine ~2,2 kb pročišćeni, a njihova koncentracija i čistoća izmjerena spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavljima 3.2.4.3. - 3.2.4.4. Tako umnožena i pročišćena cjelovita cDNA za *rCfex* veličine ~2,2 kb rabljena je kao insert u daljnjem postupku molekularnog kloniranja.

4.2.1.2. *Ligacija cjelovite cDNA za rCfex u plazmidni vektor pJET1.2/blunt i transformacija kompetentnih bakterijskih stanica E. coli soja DH5α*

Cjelovita cDNA za *rCfex* s tupim krajevima klonirana je u linearni plazmid pJET1.2/blunt s tupim krajevima pomoću enzima T4 DNA ligaze tijekom procesa ligacije (engl. *blunt-end ligation*), kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.5. Potom su kompetentne bakterijske stanice *E. coli* soja DH5α transformirane rekombinantnim plazmidom pJET1.2/blunt s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*, kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.6. Nakon transformacije bakterijskih stanica plazmid pJET1.2/blunt eksprimira smrtonosni (engl. *letal*) restrikcijski enzim koji onemogućava daljnju replikaciju bakterijskih stanica. Ubacivanjem inserta, tj. cjelovite cDNA za *rCfex* u MCS plazmida pJET1.2/blunt, sprječava se ekspresija smrtonosnog enzima te se repliciraju samo rekombinantni klonovi, tj. bakterije transformirane

rekombinantnim plazmidom. Osim ovog pozitivnog mehanizma selekcije, rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt eksprimira gen za otpornost na antibiotik ampicilin (**Slika 3, Tablica 12**) i time osigurava negativni mehanizam selekcije rasta transformiranih bakterijskih kolonija. Uspješnost transformacije bakterijskih stanica provjerena je metodom PCR na bakterijskim kolonijama kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.8. Tako je pomoću reakcije PCR pretraženo (*engl. PCR screen*) 10 različitih bakterijskih kolonija izraslih na krutoj selektivnoj LB podlozi s ciljem pronalaženja onih koje posjeduju rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*. Tijekom reakcije PCR upotrijebljene su specifične oligonukleotidne početnice (pJET1.2 F i pJET1.2. R) koje omeđuju MCS plazmida pJET1.2/blunt i tako omogućuju umnažanje kloniranog inserta, tj. cjelovite cDNA za *rCfex* veličine ~2,2 kb (**Tablica 17**). Umnoženi produkti reakcije PCR razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.6. U transformiranim bakterijskim kolonijama uočeni su produkti reakcije PCR veličine ~2,2 kb, dok isti nisu uočeni u uzorcima NTC (rezultati nisu prikazani). Dakle, rezultati PCR analize na bakterijskim kolonijama potvrdili su uspješnost transformacije bakterijskih stanica *E. coli* DH5α rekombinantnim plazmidom pJET1.2/blunt s kloniranom cDNA za *rCfex*.

4.2.1.3. *Izdvajanje plazmidne DNA (rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt) iz transformiranih bakterija i sekvenciranje klonirane cjelovite cDNA za rCfex*

Nakon odabira „pozitivnih“ bakterijskih kolonija koje posjeduju rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt, transformirane bakterijske kolonije uzgajane su tijekom noći standardnom procedurom (poglavlje 3.2.4.7) kako bi izdvojili dovoljnu količinu rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt s kloniranim odsječkom cjelovite cDNA za *rCfex*. Plazmidna DNA izdvojena je prema uputama opisanim u poglavlju 3.2.4.9., a njena koncentracija i čistoća izmjerene spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.4. Tako pripremljena plazmidna DNA rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt rabljena je za sekvenciranje ukloniranog odsječka cDNA za *rCfex* kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.10. S obzirom na veličinu kloniranog inserta od ~2,2 kb, sekvenciranje je provedeno sa 6 različitih početnica od kojih su 4 bile smještene na različitim odsječcima gena *rCfex* (F3, R3, F4 i R4) (**Tablica 11**), a 2 u regiji MCS plazmida pJET1.2/blunt (pJET1.2 F i R) (**Tablica 12**). Rezultati sravnjivanja potvrdili su da je klonirani odsječak cDNA za *rCfex* identičan slijedu nukleotida cDNA za *rCfex* (NM_001143817.1) (rezultati nisu prikazani). Drugim riječima, sekvenciranjem smo potvrdili da je cjelovita cDNA za *rCfex* veličine ~2,2 kb uspješno klonirana u plazmidni

vektor pJET1.2/blunt koji se može rabiti za konstrukciju rekombinantnog plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC kojim će se transfecirati stanice HEK293.

4.2.2. Konstrukcija rekombinantnog plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cDNA za *rCfex*

4.2.2.1. *Izrezivanje klonirane cDNA za rCfex iz rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt i spajanje u plazmidni vektor pcDNA^{TM}3.1/HisC*

Nakon što je sekvenciranjem potvrđen nukleotidni slijed kloniranog gena *rCfex*, cjelovita cDNA za *rCfex* (insert) izrezana je iz rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt (vektor). U tu svrhu je rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt izdvojen i pročišćen postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4.9., a potom inkubiran sa smjesom restrikcijskih enzima (*EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI*) (poglavlje 3.2.4.11) koji ostavljaju ljepljive krajeve (engl. *sticky ends*). Produkti cijepanja su razdvojeni elektroforezom DNA u gelu agaroze (rezultati nisu prikazani), a odsječak cDNA za *rCfex* s ljepljivim krajevima (~2,2 kb) izrezan je iz gela i pročišćen postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4.3. Plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC je u daljnjim postupcima kloniranja rabljen kao plazmidni vektor za transfekciju stanica HEK293. U tu svrhu je najprije inkubiran smjesom restrikcijskih enzima *(EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI)* koji ostavljaju ljepljive krajeve i defosfatazom (poglavlje 3.2.4.11). Uklanjanje fosfatnih skupina na slobodnim ljepljivim krajevima plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC olakšalo je ligaciju inserta i vektora. Potom su produkti digestije razdvojeni elektroforezom DNA u gelu agaroze (rezultati nisu prikazani), a plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC s tupim krajevima izrezan je iz gela i pročišćen kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.3. Prije postupka ligacije, čistoća i koncentracija inserta (cjelovita cDNA za rCfex) i vektora (pcDNA^{TM}3.1/HisC) određena je spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.4. Cjelovita cDNA za *rCfex* s ljepljivim krajevima (insert) klonirana je u plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC s ljepljivim krajevima (vektor) pomoću enzima T4 DNA ligaze tijekom procesa ligacije (engl. *sticky-end ligation*) (**Tablice 23** i **24**). Upotrebom dvaju različitih kombinacija restrikcijskih enzima omogućena je konstrukcija dva različita rekombinantna plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC od kojih jedan, uz ukloniranu cDNA za *rCfex,* posjeduje i dodatne biljege (poliHis i Xpress). Dakle, plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC obrađen restrikcijskim enzimima *EcoRI/ApaI* uz kloniranu sekvencu cDNA za *rCfex* sadržava i biljege poliHis i Xpress.

4.2.2.2. *Transformacija kompetentnih bakterijskih stanica E. coli soja DH5α rekombinantnim plazmidima pcDNA^{TM}3.1/HisC*

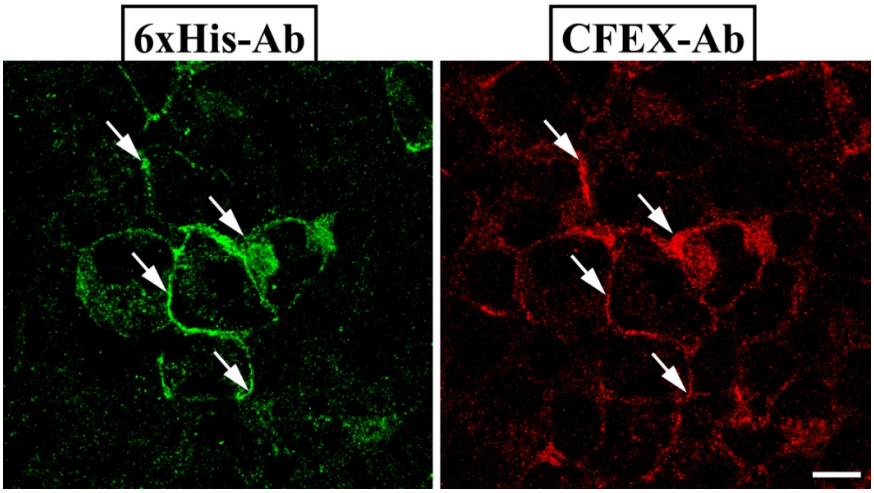
Kompetentne bakterijske stanice *E. coli* soja DH5α transformirane su konstruiranim rekombinantnim plazmidima pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* (poglavlje 3.2.4.6), a odabir tzv. „pozitivnih'" bakterijskih kolonija koje posjeduju rekombinantni plazmid proveden je reakcijom PCR na bakterijskim kolonijama (poglavlje 3.2.4.8). U tu svrhu su korištene oligonukleotidne početnice specifične za regije koje omeđuju MCS plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC kako bi se umnožila cjelovita cDNA za *rCfex* veličine ~2,2 kb. Tako je pretraženo 10 različitih klonova transformiranih rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji uz cDNA za *rCfex* sadrži biljege poliHis i Xpress (*EcoRI/ApaI*) i 10 različitih klonova transformiranih rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji sadrži cDNA za *rCfex*, ali ne sadrži navedene biljege (*NheI/ApaI*). Umnoženi produkti reakcije PCR na bakterijskim kolonijama razdvojeni su elektroforezom u gelu agaroze. U transformiranim bakterijskim kolonijama uočeni su produkti reakcije PCR veličine ~2,2 kb, dok isti nisu uočeni u uzorcima NTC (rezultati nisu prikazani). Drugim riječima, rezultati PCR analize na bakterijskim kolonijama potvrdili su uspješnost transformacije bakterijskih stanica *E. coli* DH5α konstruiranim rekombinantnim plazmidima pcDNA^{TM}3.1/HisC.

4.2.2.3. *Izdvajanje plazmidne DNA (rekombinantni plazmidi pcDNA^{TM}3.1/HisC) iz transformiranih bakterija*

Nakon odabira „pozitivnih" bakterijskih kolonija koje posjeduju rekombinantne plazmide pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*, transformirani bakterijski klonovi uzgojeni su u tekućem hranjivom LB mediju s ampicilinom prema standardnoj proceduri (poglavlje 3.2.4.7). Potom su izdvojene DNA rekombinantnih plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.9., a njihova čistoća i koncentracija je izmjerena spektrofotometrijski kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.4. Provjera ugradnje inserta u konstruirane plazmide izvršena je cijepanjem restrikcijskim enzimima *EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI* (**Tablice 19 i 20**), a odsječci DNA očekivane veličine dobiveni elektroforezom u agaroznom gelu (rezultati nisu prikazani) potvrdili su uspješnost ugradnje cDNA za *rCfex* u plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC. Izdvojeni i pročišćeni rekombinantni plazmidi pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* korišteni su za prolaznu transfekciju stanica HEK293 kako je opisano u sljedećem poglavlju.

4.3. Transfekcija stanica HEK293 rekombinantnim plazmidima pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*

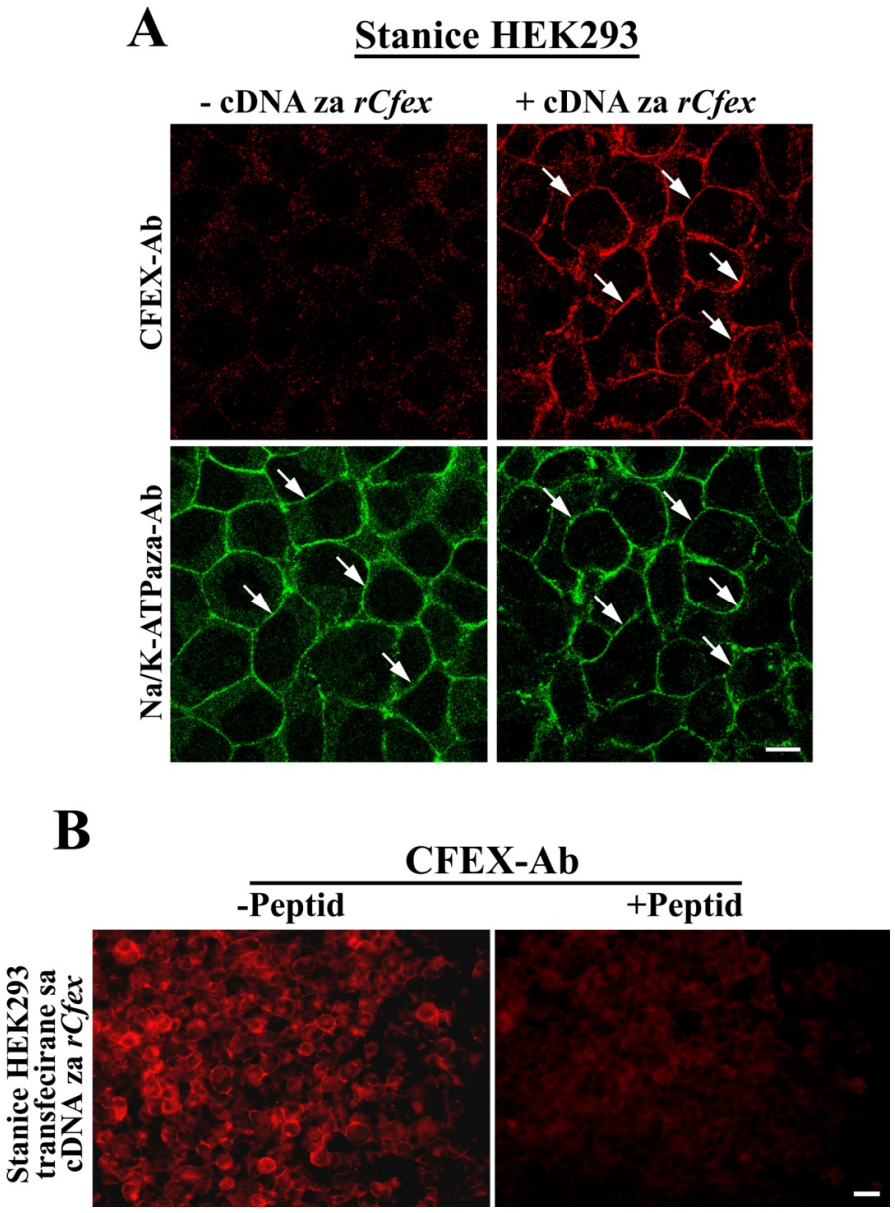
Stanice HEK293 uzgajane su na pokrovnim stakalcima i prolazno transfecirane dvama rekombinantnim plazmidima: 1) pcDNA^{TM}3.1/HisC koji uz cDNA za *rCfex* sadrži biljege (poliHis i Xpress) i 2) pcDNA^{TM}3.1/HisC koji sadrži samo cjelovitu cDNA za *rCfex*. Kao negativna kontrola rabljene su HEK293 stanice transfecirane plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji ne sadrži cDNA za *rCfex* (kontrolne stanice). Za potrebe imunofluorescencijske analize transfecirane stanice HEK293 fiksirane su 4 % paraformaldehidom kao što je opisano u poglavlju 3.2.6.2. Kako bi potvrdili uspješnost transfekcije stanica HEK293, izvedeno je dvostruko imunofluorescencijsko bojenje upotrebom dvaju protutijela: 1) protutijelo za polihistidinski biljeg (6xHis-Ab) (zelena fluorescencija) i protutijelo za protein rCfex (CFEX-Ab) (crvena fluorescencija) (**Slika 12**). Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da je polihistidinski biljeg smješten na staničnoj membrani stanica HEK293 transfeciranih rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji pored klonirane cDNA za *rCfex* sadrži i biljeg poliHis (**Slika 12,** 6xHis-Ab, zelena fluorescencija). Ista lokalizacija pronađena je za protein rCfex (**Slika 12,** CFEX-Ab, crvena fluorescencija). Dakle, rezultati dvostrukog imunofluorescencijskog bojenja nedvojbeno su potvrdili da su stanice HEK293 uspješno transfecirane plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cDNA za *rCfex*.



Slika 12. Ispitivanje uspješnosti transfekcije stanica HEK293 transfeciranih rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* i polihistidinskim biljegom (6xHis); imunofluorescencijska analiza. U fiksiranim stanicama HEK293 transfeciranim rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC koji sadrži cjelovitu cDNA za *rCfex* i polihistidinski biljeg, provedeno je dvostruko imunofluorescencijsko bojenje upotrebom dvaju protutijela: 1) protutijelo za polihistidinski biljeg (6xHis-Ab) i 2) protutijelo za protein rCfex (CFEX-Ab). Protutijelo 6xHis-Ab obojilo je staničnu membranu transfeciranih stanica (zelena fluorescencija, označeno strelicama). U istim stanicama protutijelo CFEX-Ab obojilo je staničnu membranu (crvena fluorescencija, označeno strelicama). Mjera = 5 μm.

4.3.1. Ispitivanje specifičnosti protutijela za rCfex (CFEX-Ab) u stanicama HEK293 transfeciranim s cjelovitom cDNA za *rCfex*

Nakon što je imunofluorescencijskom analizom potvrđena uspješnost transfekcije stanica HEK293 rekombinantnim plazmidima s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* (**Slika 12**), u daljnjim pokusima ispitana je specifičnost protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) pomoću HEK293 stanica transfeciranih sa cDNA za *rCfex* (**Slika 13**). Kako bi se protutijelo CFEX-Ab učinkovito vezalo za protein rCfex, prvo su ispitani različiti protokoli otkrivanja antigena (engl. *antigen retrieval*) (poglavlje 3.2.6.3) koji su pokazali da optimalni uvjeti za detekciju proteina rCfex tijekom imunofluorescencijske analize uključuju obradu deterdžentima i zagrijavanje tijekom 5 min u citratnom puferu pH 6 (1 x) (rezultati nisu prikazani). Potom je pri tim uvjetima provedena imunofluorescencijska analiza kojom je ispitana specifičnost protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) (**Slika 13**). U stanicama HEK293 transfeciranim sa cDNA za *rCfex*, protutijelo CFEX-Ab obojilo je staničnu membranu (**Slika 13A**, CFEX-Ab, +cDNA za *rCfex,* crvena fluorescencija), dok imunofluorescencijsko bojenje nije uočeno u staničnim membranama kontrolnih stanica HEK293 (koje nisu transfecirane sa cDNA za *rCfex*) (**Slika 13A**, CFEX-Ab, -cDNA za *rCfex,* crvena fluorescencija). Za razliku od protutijela CFEX-Ab, protutijelo Na/K-ATPaza-Ab obojilo je staničnu membranu i u kontrolnim (**Slika 13A**, Na/K-ATPaza-Ab, -cDNA za *rCfex,* zelena fluorescencija) i u stanicama HEK293 koje su transfecirane sa cDNA za *rCfex* (**Slika 13A**, Na/K-ATPaza-Ab, +cDNA za *rCfex,* zelena fluorescencija). Nadalje, specifičnost protutijela CFEX-Ab dodatno je potvrđena inkubacijom primarnog protutijela CFEX-Ab odgovarajućim imunizacijskim peptidom (**Slika 13B**). U odsustvu peptida, protutijelo CFEX-Ab obojilo je membranu stanica HEK293 transfeciranih sa cDNA za *rCfex* (**Slika 13B, -**P). Nakon predinkubacije protutijela CFEX-Ab imunizacijskim peptidom, imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex nije uočeno (**Slika 13B,** +P). Dakle, dobiveni rezultati imunofluorescencijske analize, prikazani na **Slici 13,** nedvojbeno su pokazali da protutijelo CFEX-Ab specifično prepoznaje protein rCfex, te se može upotrebljavati za daljnja istraživanja ekspresije proteina rCfex u različitim organima i tkivima štakora.



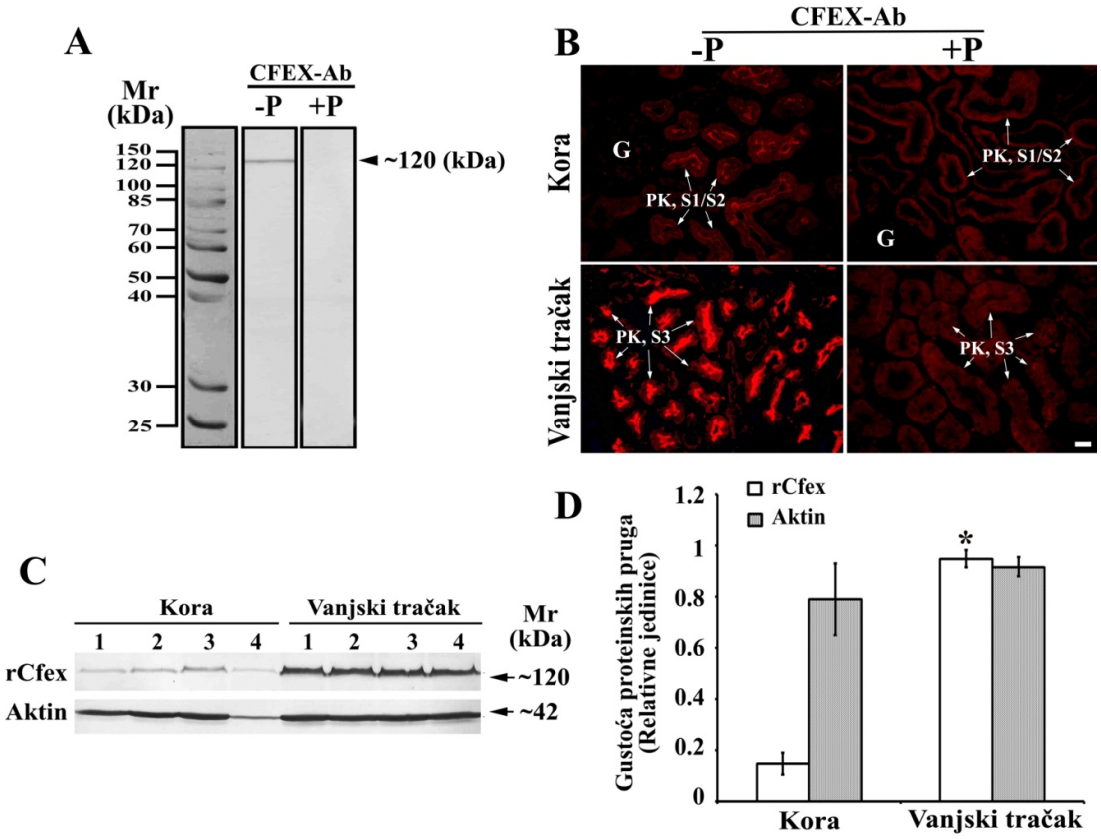
Slika 13. Ispitivanje specifičnosti protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab); imunofluorescencijska analiza. A. U fiksiranim stanicama HEK293 transfeciranim sa cDNA za *rCfex*, protutijelo CFEX-Ab obojilo je staničnu membranu (označeno strelicama, crvena fluorescencija), dok je stanična membrana kontrolnih stanica HEK293 transfeciranih plazmidom koji ne sadrži cDNA za *rCfex* ostala neobojana. Protutijelo Na/K-ATPaza-Ab obojilo je staničnu membranu u oba tipa stanica (označeno strelicama, zelena fluorescencija). Mjera = 5 μm. **B.** U fiksiranim stanicama HEK293 transfeciranim sa cDNA za *rCfex*, protutijelo CFEX-Ab obojilo je staničnu membranu (-P), dok je imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u potpunosti izostalo predinkubacijom protutijela CFEX-Ab s imunizacijskim peptidom (+P). Mjera = 20 μm.

4.4. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex

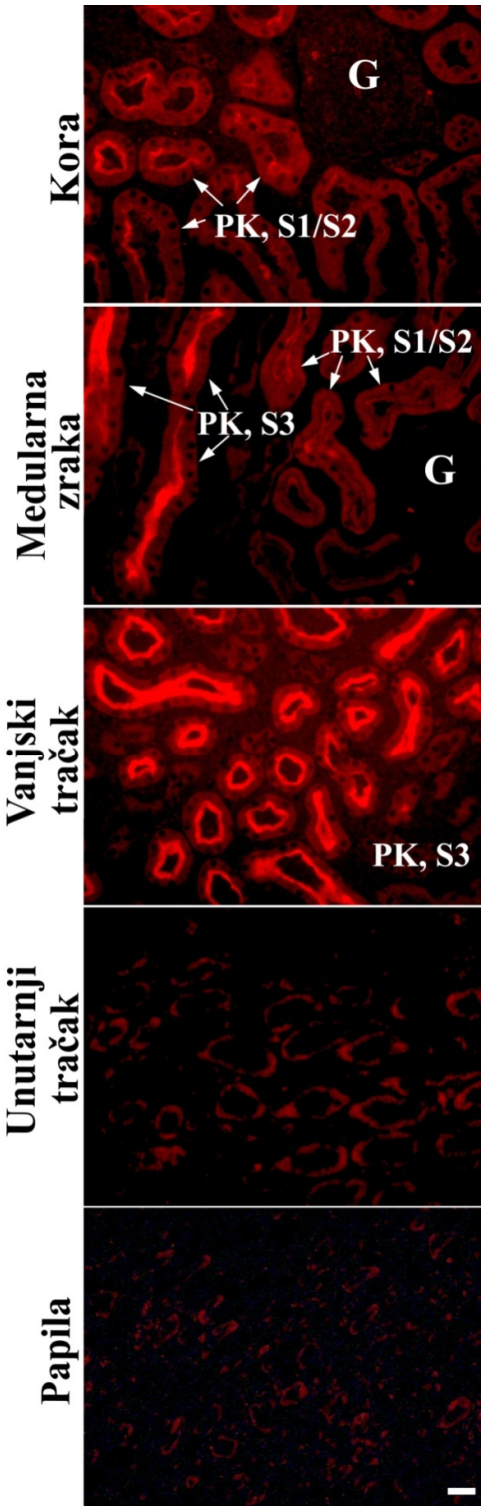
Nakon potvrde specifičnosti protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) (**Slika 13**), u daljnjim pokusima ispitani su optimalni uvjeti za detekciju proteina rCfex u različitim organima i tkivima štakora metodama imunofluorescencijske i western analize. Za potrebe western analize, uzorci ukupnih staničnih membrana izdvojenih iz različitih tkiva i organa štakora denaturirani su u prisustvu i odsustvu reducirajućeg agensa β-merkaptoetanola (β-ME) pri različitim temperaturama tijekom različitog vremenskog perioda (37°C/30 min, 65°C/15 min i 95°C/5 min), te su pripremljeni u puferu Laemli prema opisu u poglavlju 3.2.5.3. Rezultati western analize pokazali su da optimalni uvjeti za detekciju proteina rCfex uključuju denaturaciju proteina u reducirajućem puferu (s β-ME) neovisno o temperaturi i vremenu grijanja (rezultati nisu prikazani), te su svi ispitani uzorci staničnih membrana pripremljeni u reducirajućem puferu pri temperaturi 65°C tijekom 15 min. Za potrebe imunofluorescencijske analize, na narescima tkiva i organa štakora ispitani su različiti protokoli otkrivanja antigena prema opisu u poglavlju 3.2.6.3. Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da optimalni protokol za detekciju proteina rCfex u svim ispitanim organima i tkivima štakora uključuje obradu deterdžentima i zagrijavanje uzoraka u citratnom puferu pH 6 (4 x) (rezultati nisu prikazani). Navedeni optimalni uvjeti za detekciju proteina rCfex tijekom western i imunofluorescencijske analize korišteni su za daljnje ispitivanje ekspresije i stanične lokalizacije proteina rCfex u različitim tkivima i organima štakora. U tu svrhu je rabljeno specifično protutijelo za protein rCfex (CFEX-Ab) u prisustvu ili odsustvu odgovarajućeg imunizacijskog peptida, a sva istraživanja provedena su u ukupnim staničnim membranama i tkivnim narescima iz različitih organa štakora muškog spola.

4.4.1. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u bubrezima štakora

Rezultati western analize pokazali su da u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega, protutijelo CFEX-Ab obilježava jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (**Slika 14A,** -P) koja nije detektirana nakon blokade protutijela imunizacijskim peptidom (**Slika 14A,** +P). Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da je protein rCfex smješten u četkastoj membrani proksimalnih kanalića koji se nalaze u kori (odsječci S1 i S2) i vanjskom tračku (odsječci S3) bubrega (**Slika 14B,** -P). Nakon predinkubacije protutijela CFEX-Ab imunizacijskim peptidom, obojenje četkaste membrane proksimalnih kanalića (odsječci S1, S2 i S3) u potpunosti je nestalo (**Slika 14B,** +P). Nadalje, intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za protein rCfex u četkastim membranama odsječaka S3 (koji su smješteni u vanjskom tračku i medularnim zrakama) je veći u odnosu na četkaste membrane odsječaka S1 i S2 (koji su smješteni u kori) (**Slika 14B,** -P). Rezultati western analize potvrdili su rezultate imunofluorescencijske analize; gustoća proteinskih pruga proteina rCfex (~120 kDa) je ~7,3 puta jača u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz vanjskog tračka u odnosu na ukupne stanične membrane izdvojene iz kore bubrega (**Slike 14C i 14D**). Drugim riječima, u bubrezima štakora uočene su zonske (kora < vanjski tračak) i segmentne (S3 > (S1~S2)) razlike u ekspresiji proteina rCfex. Također, ispitana je stanična lokalizacija proteina rCfex duž čitavog nefrona u bubregu štakora. Kao što je prikazano na **Slici 15**, protein rCfex smješten je u četkastoj membrani proksimalnih kanalića koji se nalaze u kori (odsječci S1 i S2), medularnim zrakama (odsječci S3) i vanjskom tračku (odsječci S3) bubrega, ali nije detektiran u ostalim dijelovima nefrona uključujući unutarnji tračak i papilu.



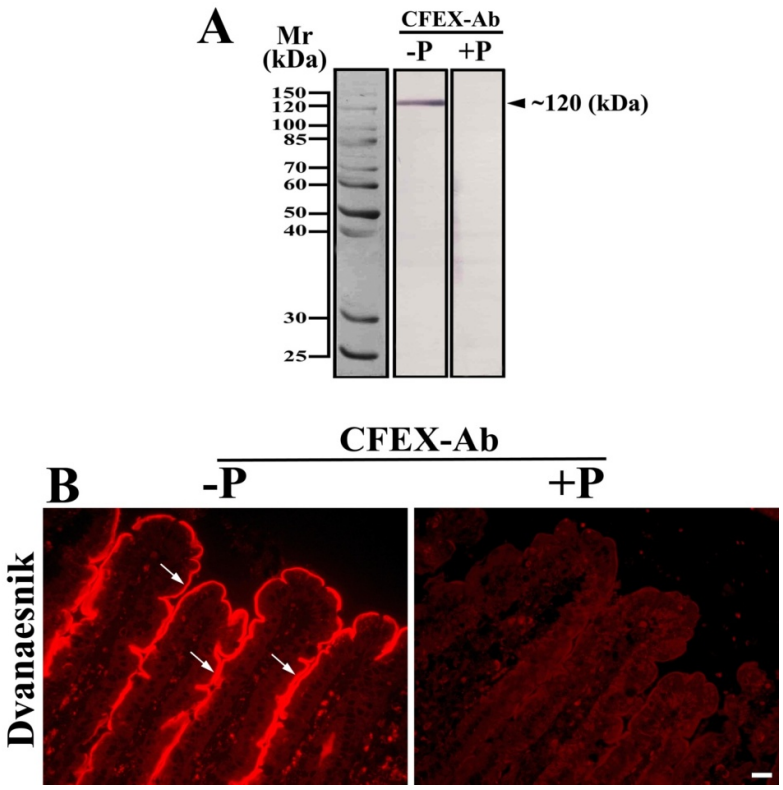
Slika 14. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u bubrezima štakora, zonske razlike A. Western analiza. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega štakora, protutijelo CFEX-Ab obilježilo je jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (-P) koja je blokirana imunizacijskim peptidom (+P). Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Imunofluorescencijska analiza.** U fiksiranim narescima bubrega štakora, protutijelo CFEX-Ab obojilo je četkastu membranu proksimalnih kanalića (PK) smještenih u kori (odsječci S1 i S2) i vanjskom tračku (odsječci S3) bubrega (-P). Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u potpunosti je izostalo upotrebom protutijela CFEX-Ab koje je blokirano imunizacijskim peptidom (+P). Mjera = 20 µm. PK – proksimalni kanalići, G – glomerul. **C. Western analiza, zonske razlike.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) veća je u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz vanjskog tračka bubrega u odnosu na ukupne stanične membrane izdvojene iz kore bubrega. Ekspresija aktina (~42 kDa), koji je korišten kao kontrola nanošenja proteina, podjednaka je u svim ispitanim uzorcima. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **D. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) je ~7,3 puta jača u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz vanjskog tračka u odnosu na ukupne stanične membrane izdvojene iz kore bubrega. Gustoća proteinskih pruga za aktin (~42 kDa) podjednaka je u obje zone bubrega. Gustoća proteinskih pruga izmjerena je računalnim programom *ImageJ*. Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na prugu s najvećom ekspresijom proteina rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana bubrega (n = 4, kora; n = 4, vanjski tračak). **vs.* kora, $P < 0.05$.



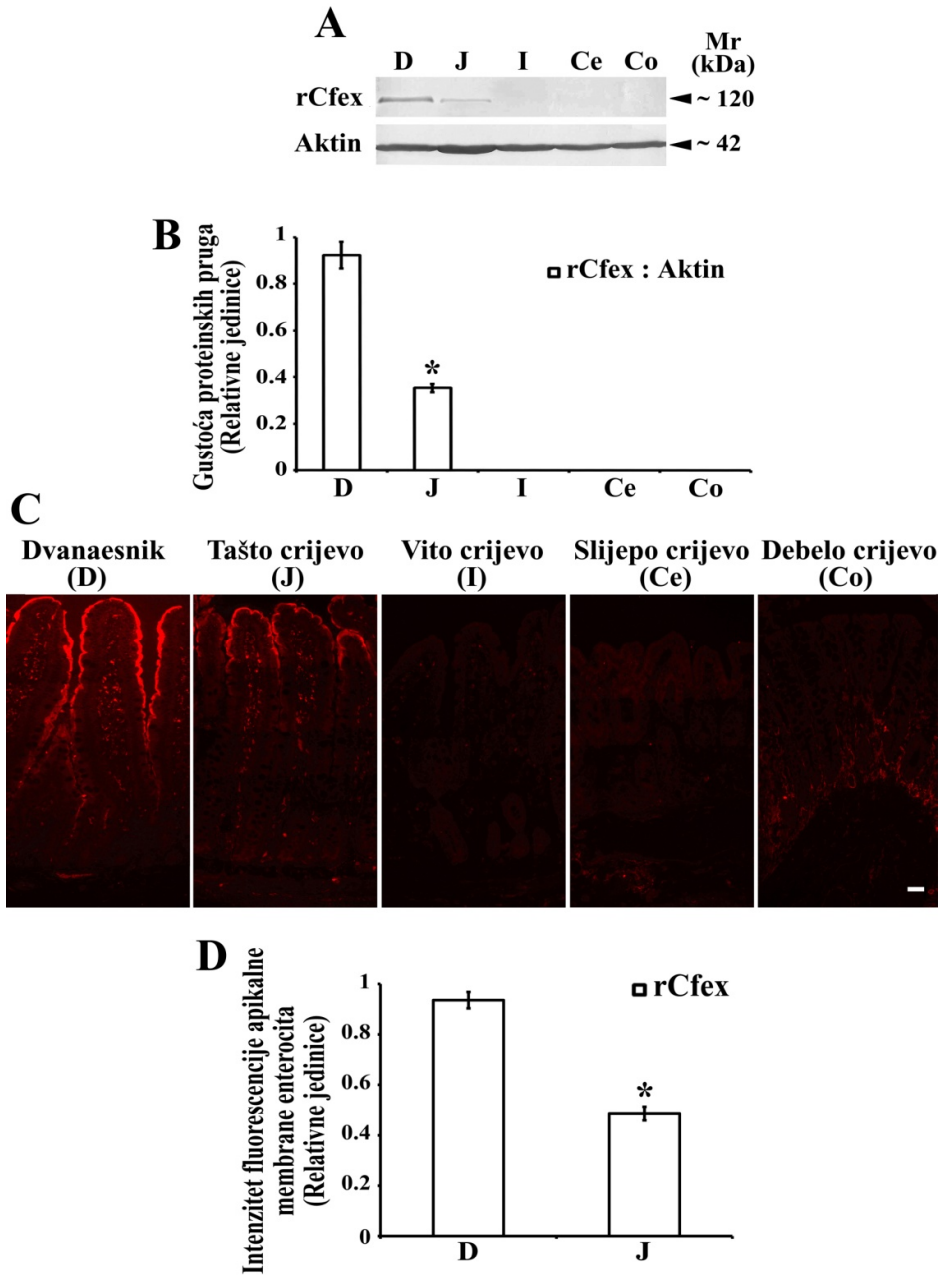
Slika 15. Stanična lokalizacija proteina rCfex duž nefrona u bubregu štakora. U fiksiranim uzorcima bubrega štakora provedeno je imunofluorescencijsko bojenje pomoću protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab). Protutijelo CFEX-Ab obojilo je četkastu membranu proksimalnih kanalića (PK) smještenih u kori (odsječci S1, S2), medularnim zrakama (odsječci S3) i vanjskom tračku (odsječci S3) bubrega. Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex nije uočeno u glomerulima (G), unutarnjem tračku i papili. Mjera = 20 μm. PK – proksimalni kanalići, G – glomerul.

4.4.2. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u crijevima štakora

Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex ispitana je u crijevima štakora uključujući dvanaesnik, tašto crijevo, vito crijevo, slijepo crijevo i debelo crijevo. Budući da je u dvanaesniku detektirana najveća ekspresija mRNA za *rCfex* (**Slika 10**), uzorci dvanaesnika upotrijebljeni su za imunokemijsku karakterizaciju protutijela CFEX-Ab tijekom western i imunofluorescencijske analize (**Slika 16**). Rezultati western analize pokazali su da u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz dvanaesnika crijeva, protutijelo CFEX-Ab obilježava jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (**Slika 16A,** -P) koja nije detektirana nakon blokade protutijela imunizacijskim peptidom (**Slika 16A,** +P). Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da je protein rCfex smješten u četkastoj membrani enterocita dvanaesnika (**Slika 16B,** -P). Nakon predinkubacije protutijela CFEX-Ab imunizacijskim peptidom, obojenje četkaste membrane enterocita u potpunosti je nestalo (**Slika 16B,** +P). Nadalje, rezultati imunokemijske analize uključujući western i imunofluorescencijsku analizu ukazali su na postojanje zonskih razlika u ekspresiji proteina rCfex duž crijeva štakora (**Slika 17**). Tako su proteinske pruge za protein rCfex (~120 kDa) detektirane u ukupnim staničnim membrana izdvojenim iz dvanaesnika i taštog crijeva, a nisu detektirane u ostalim dijelovima crijeva uključujući vito crijevo, slijepo crijevo i debelo crijevo (**Slika 17A**). Omjer gustoće proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) i aktin (~42 kDa) bio je ~2,6 puta veći u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz dvanaesnika u odnosu na tašto crijevo (**Slika 17B**). Rezultati imunofluorescencijske analize potvrdili su rezultate western analize; imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex uočeno je u četkastim membranama dvanaesnika i taštog crijeva, a nije detektirano u ostalim zonama crijeva kao što su vito crijevo, slijepo crijevo i debelo crijevo (**Slika 17C**). Sukladno rezultatima western analize, intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za protein rCfex u četkastim membranama enterocita je ~2,5 puta veći u dvanaesniku u odnosu na tašto crijevo (**Slika 17D**). Nadalje, rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da je jačina imunofluorescencijskog bojenja za protein rCfex u četkastim membranama enterocita (koji su smješteni u dvanaesniku i taštom crijevu) veća pri vrhu crijevnih resica u odnosu na donje dijelove crijevnih resica (**Slika 18**). Dakle, u crijevima štakora uočene su zonske razlike u ekspresiji proteina rCfex (dvanaesnik > tašto crijevo) i nejednolika ekspresija proteina rCfex uzduž crijevnih resica dvanaesnika i taštog crijeva (vrh crijevnih resica > dno crijevnih resica).

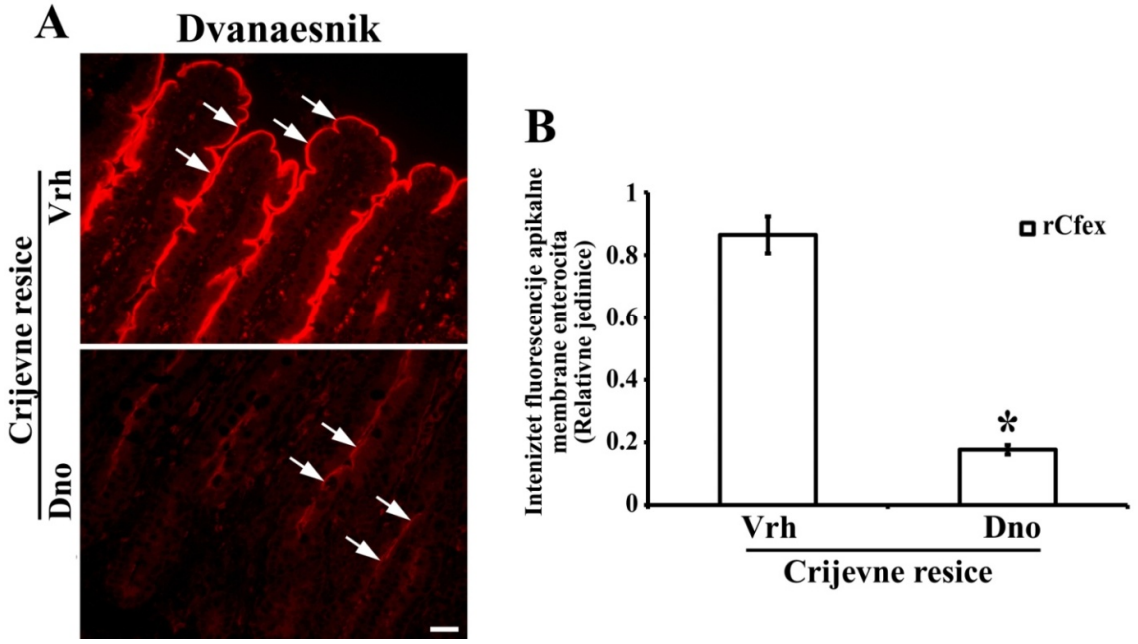


Slika 16. Imunokemijska karakterizacija protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) u dvanaesniku štakora. A. Western analiza. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz dvanaesnika štakora, protutijelo CFEX-Ab obilježilo je jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (-P) koja je blokirana imunizacijskim peptidom (+P). Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Imunofluorescencijska analiza**. U fiksiranim narescima dvanaesnika štakora, protutijelo CFEX-Ab obojilo je četkastu membranu enterocita (označeno strelicama) (-P). Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u potpunosti je izostalo upotrebom protutijela CFEX-Ab koje je predinkubirano imunizacijskim peptidom (+P). Mjera = 20 µm.



Slika 17. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex duž crijeva u štakora; zonske razlike. U crijevima štakora provedena je western i imunofluorescencijska analiza upotrebom protutijela CFEX-Ab pri čemu je gustoća proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjeren računalnim programom *ImageJ*. **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) veća je u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz dvanaesnika u odnosu na tašto crijevo (D > J). Ekspresija aktina (~42 kDa), koji je poslužio kao kontrola nanošenja proteina, nije bila ujednačena (D < J). Stoga je za usporedbu ekspresije proteina rCfex duž različitih zona crijeva korišten omjer gustoće proteinskih pruga rCfex (~120 kDa) : aktin (~42 kDa). Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Omjer gustoće proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) i aktin (~42 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz dvanaesnika je ~2,6 puta veći od istog omjera u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz taštog crijeva. Stupci prikazuju omjer gustoće proteinskih pruga (rCfex:Aktin) u odnosu na

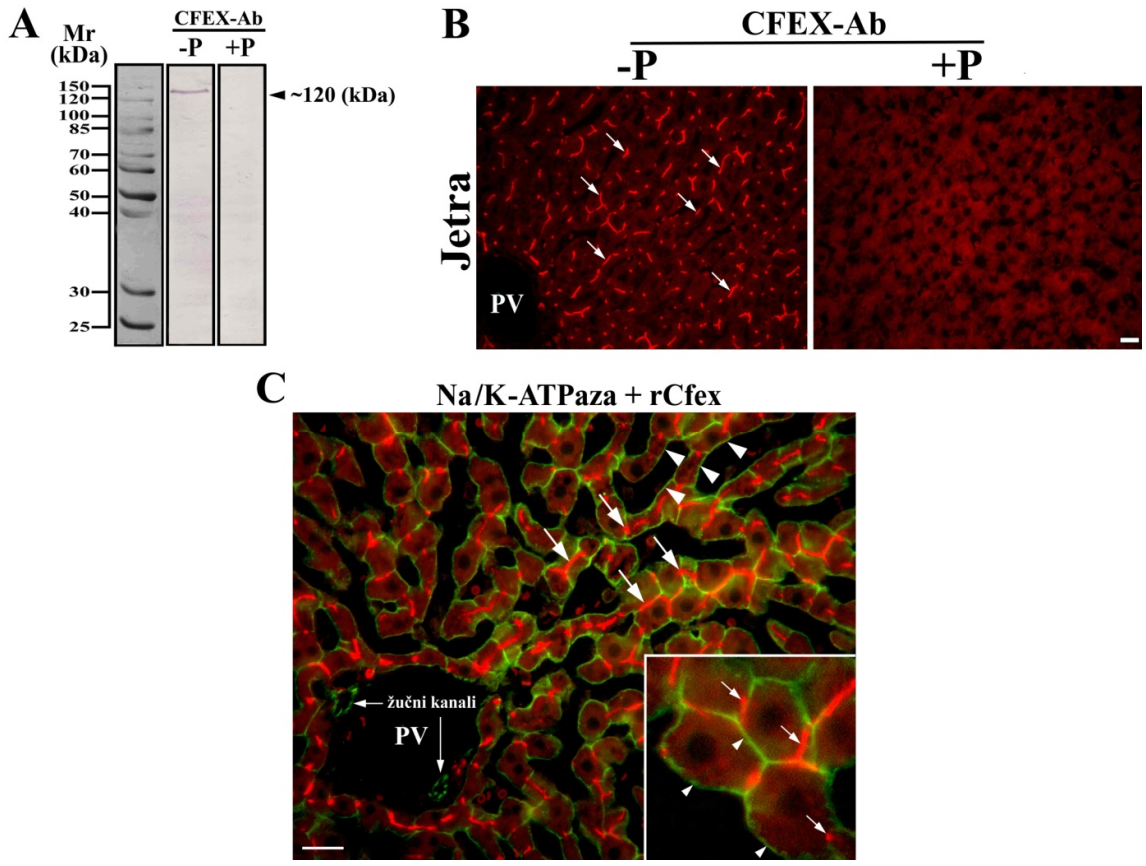
Slika 17. – nastavak; omjer gustoće proteinskih pruga (rCfex:Aktin) koji ukazuje na relativno najveću ekspresiju proteina rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 3 nezavisna uzorka (n = 3, dvanaesnik; n = 3, tašto crijevo). **C. Imunofluorescencijska analiza.** U fiksiranim uzorcima crijeva štakora, protutijelo CFEX-Ab obojilo je četkastu membranu enterocita u dvanaesniku i taštom crijevu, dok imunofluorescencijsko bojenje za rCfex nije uočeno u ostalim dijelovima crijeva uključujući vito crijevo, slijepo crijevo i debelo crijevo. Intenzitet imunofluorescencijskog obojenja za rCfex veći je u četkastoj membrani enterocita smještenih u dvanaesniku nego u taštom crijevu (D > J). Mjera = 20 μm. **D. Denzitometrijsko mjerenje intenziteta fluorescencije.** Intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama enterocita smještenim u dvanaesniku je ~1,9 puta veći u odnosu na četkaste membrane enterocita u taštom crijevu. Rezultati su prikazani kao relativna imunofluorescencija za protein rCfex izmjerena u četkastim membranama enterocita iz pojedine zone crijeva u odnosu na jačinu imunofluorescencijskog bojenja u četkastim membranama enterocita dvanaesnika (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE dobivene mjerenjem 24 područja četkaste membrane iz 4 nezavisne kriosekcije (n = 24; 6 kanalića/kriosekciji). **vs.* dvanaesnik, $P < 0.05$. Mjera = 20μm. D – Dvanaesnik (duodenum), J – Tašto crijevo (jejunum), I – Vito crijevo (ileum), Ce – Slijepo crijevo (caecum), Co – Debelo crijevo (colon).



Slika 18. Ekspresija proteina rCfex duž crijevnih resica u dvanaesniku štakora; usporedba vrha i dna crijevnih resica. U fiksiranim narescima dvanaesnika štakora, provedena je imunofluorescencijska analiza upotrebom protutijela CFEX-Ab, a intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjeren je računalnim programom *ImageJ*. **A. Imunofluorescencijska analiza.** Intenzitet imunofluorescencijskog obojenja za protein rCfex veći je četkastoj membrani enterocita koji su smješteni pri vrhu nego li pri dnu crijevnih resica dvanaesnika. Mjera = 20 μm. **B. Denzitometrijsko mjerenje intenziteta fluorescencije.** Intenzitet bojenja četkaste membrane proteina rCfex pri vrhu crijevne resice veći je ~4,9 puta u odnosu na četkastu membranu enterocita pri dnu crijevne resice. Rezultati su prikazani kao relativna imunofluorescencija za protein rCfex izmjerena u četkastim membranama enterocita pri vrhu i dnu crijevnih resica dvanaesnika u odnosu na jačinu imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama enterocita pri vrhu crijevnih resica dvanaesnika (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE dobivene mjerenjem 24 područja četkaste membrane iz 4 nezavisne kriosekcije dvanaesnika (n = 24; 6 kanalića/kriosekciji). *$vs.$ vrh crijevne resice dvanaesnika, $P < 0.05$.

4.4.3. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u jetri štakora

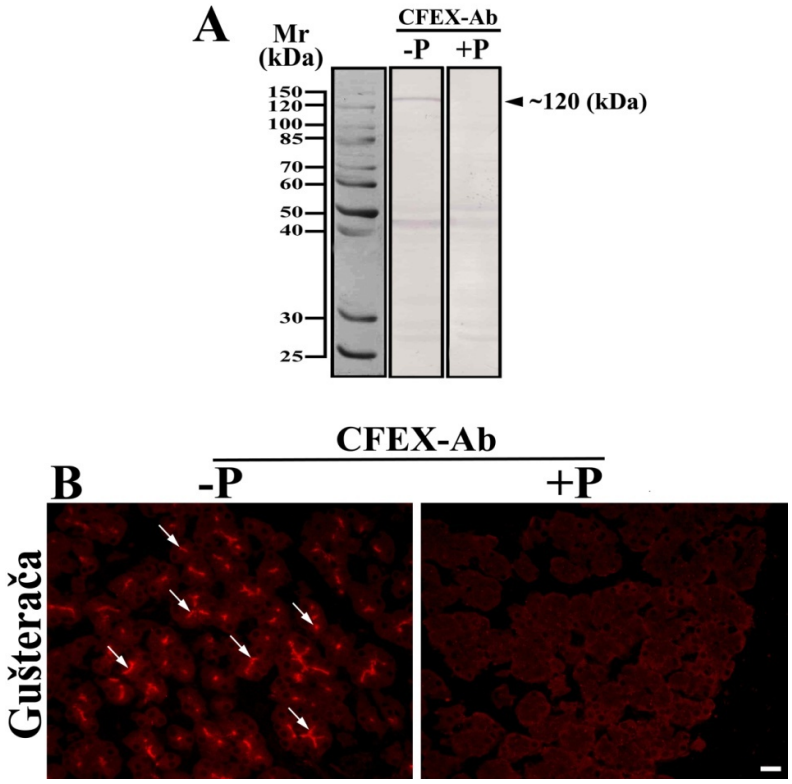
Rezultati western analize pokazali su da u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz jetre štakora, protutijelo CFEX-Ab obilježava jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (**Slika 19A,** -P) koja nije detektirana nakon blokade protutijela imunizacijskim peptidom (**Slika 19A,** +P). Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da je protein rCfex smješten u kanalikularnoj membrani hepatocita (**Slika 19B,** -P). Nakon predinkubacije protutijela CFEX-Ab imunizacijskim peptidom, imunofluorescencijsko obojenje za rCfex u kanalikularnim membranama hepatocita u potpunosti je nestalo (**Slika 19B,** +P). Kako bi potvrdili točan smještaj proteina rCfex u hepatocitima štakora, izvedeno je dvostruko imunofluorescencijsko bojenje prema opisu u poglavlju 3.2.6.3. U tu svrhu su upotrjebljena protutijela za dva proteina: 1) Na/K-ATPazu (zelena fluorescencija) i 2) rCfex (crvena fluorescencija). Tako su rezultati imunofluorescencijske analize pokazali da su proteini rCfex i Na/K-ATPaza smješteni u različitim domenama stanične membrane hepatocita; Na/K-ATPaza smještena je u sinusoidalnoj (**Slika 19C**, Na/K-ATPaza + rCfex, zelena fluorescencija), a protein rCfex u kanalikularnoj (**Slika 19C**, Na/K-ATPaza + rCfex, crvena fluorescencija) membrani hepatocita.



Slika 19. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u jetri štakora. A. Western analiza. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz jetre štakora, protutijelo za protein rCfex (CFEX-Ab) obilježilo je jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (-P) koja je blokirana imunizacijskim peptidom (+P). Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Imunofluorescencijska analiza, jednostruko bojenje.** U fiksiranim narescima jetre štakora, protutijelo CFEX-Ab obojilo je kanalikularnu membranu hepatocita (označeno strelicama) (-P). Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u potpunosti je izostalo upotrebom protutijela CFEX-Ab koje je predinkubirano imunizacijskim peptidom (+P). Mjera = 20 µm. **C. Imunofluorescencijska analiza, dvostruko bojenje**. U fiksiranim narescima jetre štakora provedeno je dvostruko imunofluorescencijsko bojenje pomoću protutijela za Na/K-ATPazu (zelena fluorescencija) i rCfex (crvena fluorescencija) pri čemu su zelena i crvena fluorescencija preklopljene *in silico* (Na/K-ATPaza + rCfex). Protutijelo Na/K-ATPaza-Ab obojilo je sinusoidalne membrane hepatocita (zelena fluorescencija, označeno vrškovima strelica) i žučne kanaliće (zelena fluorescencija, označeno strelicama) smještene uz ogranak portalne vene (PV). Protutijelo CFEX-Ab obojilo je kanalikularne membrane hepatocita (crvena fluorescencija, označeno strelicama). Umetnuta slika prikazuje uvećane hepatocite u kojima je Na/K-ATPaza smještena na sinusoidalnoj (označeno vrškom strelice, zelena fluorescencija), a rCfex na kanalikularnoj (označeno strelicama, crvena fluorescencija) membrani hepatocita. Mjera = 20 µm. PV – ogranak portalne vene.

4.4.4. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u gušterači štakora

Rezultati western analize pokazali su da u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz gušterače štakora, protutijelo CFEX-Ab obilježava jednu proteinsku prugu od ~120 kDa (**Slika 20A,** -P) koja nije detektirana nakon blokade protutijela imunizacijskim peptidom (**Slika 20A,** +P). Rezultati imunofluorescencijske analize pokazali su da je protein rCfex smješten u luminalnoj membrani izvodnih kanalića gušterače (**Slika 20B,** -P). Nakon predinkubacije protutijela CFEX-Ab imunizacijskim peptidom, obojenje luminalne domene izvodnih kanalića gušterače u potpunosti je nestalo (**Slika 20B,** +P).



Slika 20. Ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u gušterači štakora. A. Western analiza. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz gušterače štakora, protutijelo za protein rCfex (CFEX-Ab) obilježilo je proteinsku prugu od ~120 kDa (-P) koja je blokirana imunizacijskim peptidom (+P). Proteinske pruge nižih molekularnih masa (~20 - 30 kDa) i (~40 - 50 kDa) nisu se blokirale imunizacijskim peptidom što upućuje na nespecifično vezanje protutijela. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Imunofluorescencijska analiza.** U fiksiranim narescima gušterače, protutijelo CFEX-Ab obojilo je luminalnu membranu izvodnih kanalića gušterače (označeno strelicama) (-P). Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u potpunosti je izostalo upotrebom protutijela CFEX-Ab koje je predinkubirano imunizacijskim peptidom (+P). Mjera = 20 µm.

4.5. Spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u štakora

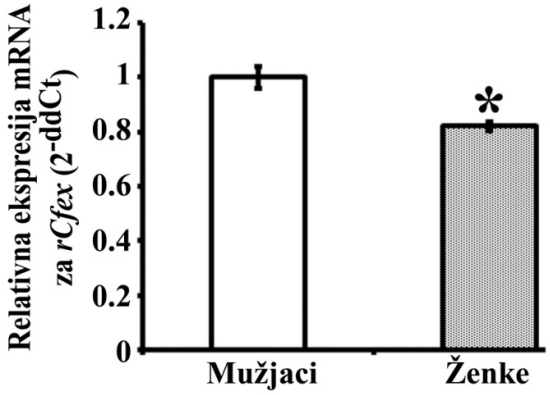
Kako bi se ispitala ovisnost ekspresije za rCfex o spolu, u istraživanjima su rabljeni spolno zreli i štakori oba spola u čijim je organima istražena ekspresija rCfex na razini mRNA (RT-PCR) i proteina (western i imunofluorescencijska analiza). Dobiveni rezultati su pokazali da je ekspresija mRNA i proteina rCfex ovisna o spolu u bubrezima (poglavlje 4.5.1.), dok u jetri (poglavlje 4.5.2.) i gušterači (poglavlje 4.5.3.) nije uočena njegova spolno-ovisna ekspresija. Kako bi utvrdili koji od spolnih hormona reguliraju ekspresiju rCfex u bubrezima štakora, izvedeni su dodatni pokusi u kojima se pratio učinak gonadektomije (kastracije i ovarijektomije) i učinak spolnih hormona (testosterona, estrogena i progesterona) u kastriranih mužjaka na ekspresiju proteina rCfex. Također, istražena je ekspresija proteina rCfex u bubrezima spolno nezrelih štakora oba spola.

4.5.1. Spolne razlike u ekspresiji rCfex u bubrezima štakora

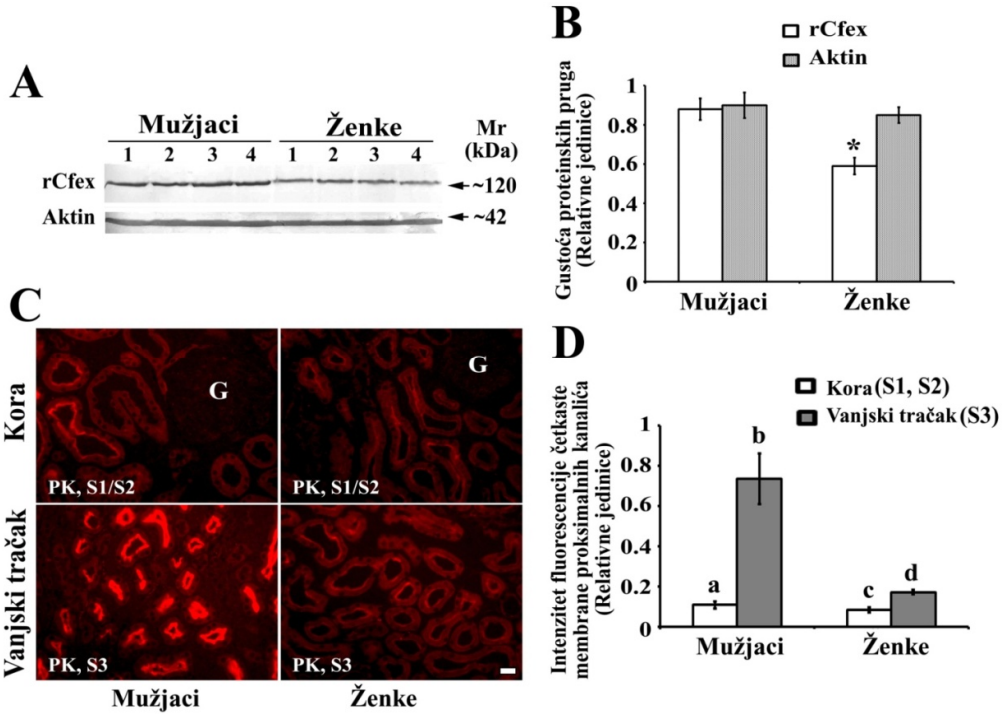
4.5.1.1. *Ekspresija mRNA i proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora*

Rezultati qRT-PCR analize ukazali su na postojanje spolnih razlika u ekspresiji mRNA za *rCfex* u bubrezima spolno zrelih štakora (**Slika 21**). Ekspresija mRNA za *rCfex* je ~1,2 puta veća u bubrezima spolno zrelih mužjaka u odnosu na spolno zrele ženke, a ekspresija mRNA za konstitutivno izraženi gen *β-aktin*, koji je upotrebljavan za normalizaciju količine cDNA, bila je podjednaka u oba spola (rezultati nisu prikazani). Sukladno tome, rezultati western i imunofluorescencijske analize prikazani na **Slici 22** potvrdili su postojanje spolnih razlika u ekspresiji proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora. Tako je ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membrana izdvojenim iz bubrega spolno zrelih mužjaka ~1,5 puta jača u odnosu na spolno zrele ženke, dok je ekspresija proteina aktina (~42 kDa) podjednaka u oba spola, ukazujući na ujednačenu količinu proteina u svim ispitanim uzorcima (**Slika 22A i B**). Također, intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za protein rCfex u četkastim membranama proksimalnih kanalića smještenih u vanjskom tračku (odsječci S3) je ~4,3 puta jači u spolno zrelih mužjaka u odnosu na spolno zrele ženke (**Slika 22C i D**). Međutim, intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama proksimalnih kanalića smještenih u kori (odsječci S1 i S2) je sličan u oba spola (**Slika 22C i D**)**.** Osim toga, intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membrana proksimalnih kanalića je ~6,8 puta veći u vanjskom tračku (odsječci S3) mužjaka i ~2 puta

veći u vanjskom tračku (odsječci S3) ženki u odnosu na pripadajuću koru (odsječci S1 i S2) (**Slika 22D**). Time je dodatno potvrđeno postojanje zonskih razlika u ekspresiji proteina rCfex u bubrezima štakora koje je opisano u poglavlju 4.4.1. Dakle, u bubrezima spolno zrelih štakora uočene su spolne razlike u ekspresiji rCfex, pri čemu je ekspresija rCfex na razini mRNA i proteina veća u spolno zrelih mužjaka u odnosu na spolno zrele ženke.



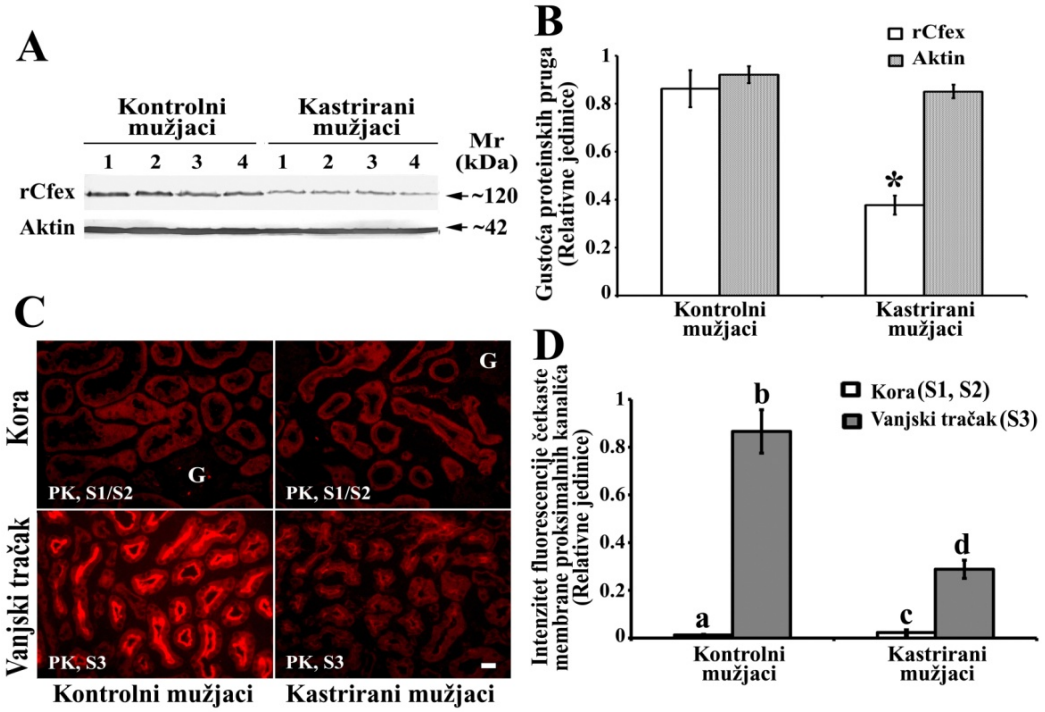
Slika 21. Ekspresija mRNA za *rCfex* u bubrezima spolno zrelih štakora; usporedba mužjaka i ženki; qRT-PCR. Iz bubrega spolno zrelih štakora (starosti 3 mjeseca) oba spola izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA. Reakcijom qRT-PCR izmjerena je relativna ekspresija mRNA za *rCfex* koja je normalizirana prema endogenoj kontroli *β-aktin* i analizirana komparativnom 2^{-ddCt} metodom. Ekspresija mRNA za *rCfex* u bubrezima spolno zrelih mužjaka je ~1,2 puta veća u odnosu na spolno zrele ženke. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija mRNA za *rCfex* u odnosu na ekspresiju mRNA za *rCfex* izmjerenu u bubregu mužjaka s najvećom razinom ekspresije mRNA za *rCfex* (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz četiri nezavisna uzorka ukupne stanične RNA (n = 4, mužjaci; n = 4, ženke). **vs.* mužjaci, $P < 0.05$. Ekspresija mRNA za *housekeeping* gen *β-aktin* (endogena kontrola) podjednaka je u bubrezima štakora oba spola (rezultati nisu prikazani).



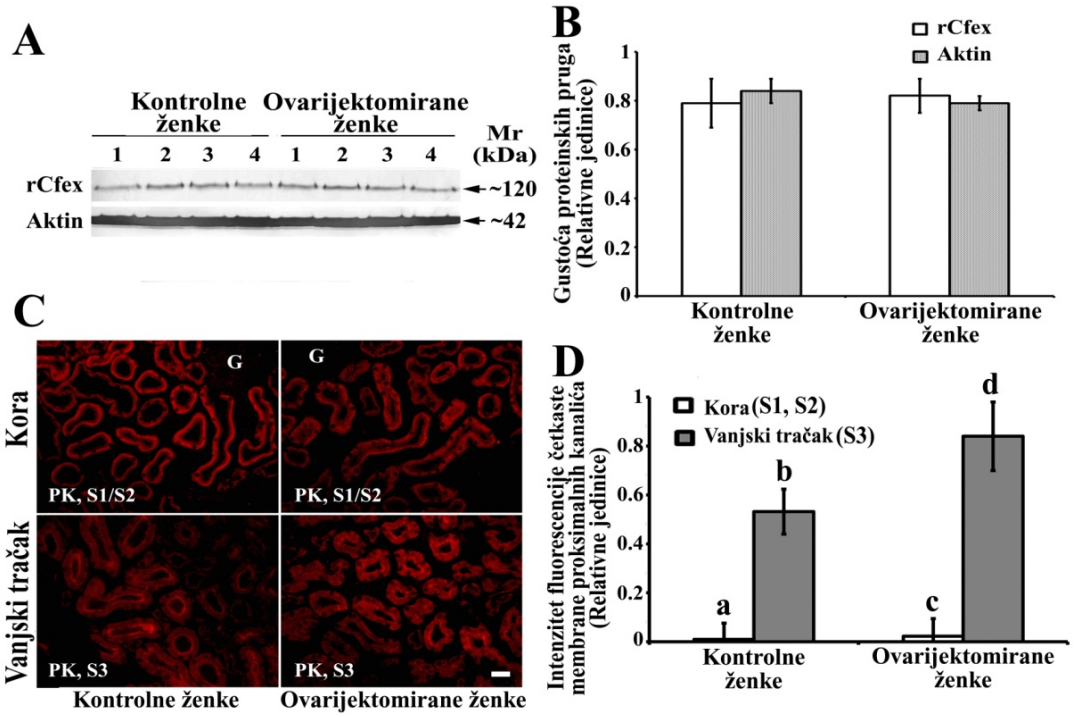
Slika 22. Ekspresija proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora; usporedba mužjaka i ženki. U bubrezima spolno zrelih štakora (starosti 3 mjeseca) oba spola provedena je western i imunofluorescencijska analiza upotrebom protutijela CFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ*. **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega spolno zrelog mužjaka je veća u odnosu na spolno zrele ženke. Ekspresija proteina aktina (~42 kDa), koji je korišten kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina, podjednaka je u svim ispitanim uzorcima oba spola. Masa proteina iznosila je 80 μg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega spolno zrelog mužjaka je ~1,5 puta veća u odnosu na spolno zrele ženke, dok je gustoća proteinskih pruga za aktin (~42 kDa) podjednaka u oba spola. Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na proteinsku prugu koja je izmjerena u spolno zrelog mužjaka s najvećom ekspresijom proteina rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana bubrega (n = 4, mužjaci; n = 4, ženke). **vs.* mužjaci, $P < 0.05$. **C. Imunofluorescencijska analiza.** Imunofluorescencijsko bojenje za rCfex u četkastim membranama odsječaka S3 (vanjski tračak) jačeg je intenziteta u spolno zrelog mužjaka u odnosu na spolno zrele ženke, dok isto obojenje u četkastim membranama odsječaka S1 i S2 (kora) je sličnog intenziteta u oba spola. Mjera = 20 μm. **D. Denzitometrijsko mjerenje intenziteta fluorescencije.** Intenzitet imunofluorescencijskog bojenja četkaste membrane za rCfex u odsječcima S3 (vanjski tračak) je ~4,3 puta veći u mužjaka u odnosu na ženke (b *vs.* d). Također, intenzitet istog bojenja u odsječcima S3 (vanjski tračak) je ~6,8 puta veći u mužjaka (a *vs.* b) i ~2 puta veći u ženki (c *vs.* d) u odnosu na pripadajuće odsječke S1 i S2 (kora). Rezultati su prikazani kao relativna imunofluorescencija za protein rCfex izmjerena u četkastim membranama proksimalnih kanalića u odnosu na jačinu najjačeg imunofluorescencijskog bojenja u četkastim membranama kanalića S3 vanjskog tračka mužjaka (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 120 proksimalnih kanalića iz 4 nezavisne kriosekcije bubrega (n = 120; 30 kanalića/kriosekciji). a *vs.* b, c *vs.* d i b *vs.* d, $P < 0.05$. G – glomerul, PK – proksimalni kanalići.

4.5.1.2. *Učinak gonadektomije na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora*

Kao što je prikazano na **Slici 23**, rezultati imunokemijskih analiza ukazali su na inhibitorni učinak kastracije na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora. Tako su rezultati western analize pokazali da se kastracijom smanjuje ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega štakora (**Slika 23A i B**). Sukladno tome, slični rezultati dobiveni su imunofluorescencijskom analizom. Kastracija je smanjila intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za protein rCfex u četkastim membranama proksimalnih kanalića S3 odsječaka smještenim u vanjskom tračku (**Slika 23C i D**). Intenzitet istog obojenja u proksimalnim kanalićima odsječaka S1 i S2, smještenih u kori, bio je podjednak u bubrezima kontrolnih i kastriranih mužjaka (**Slika 23C i D**). Kao što je prikazano na **Slici 24,** rezultati imunokemijskih analiza su pokazali da ovarijektomija ne mijenja ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora. Tako je ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega podjednaka u kontrolnih i ovarijektomiranih ženki (**Slika 24A i B**). Slični rezultati dobiveni su imunofluorescencijskom analizom; intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membrana proksimalnih kanalića S1 i S2 (kora) i S3 odsječaka (vanjski tračak) bio je podjednak u bubregu kontrolnih i ovarijektomiranih ženki (**Slika 24C i D**). Dakle, rezultati imunokemijskih analiza, uključujući western i imunofluorescencijsku analizu, pokazali su da u bubrezima štakora kastracija smanjuje ekspresiju proteina rCfex u proksimalnim kanalićima vanjskog tračka bubrega (odsječci S3), dok se njegova ekspresija ne mijenja ovarijektomijom.



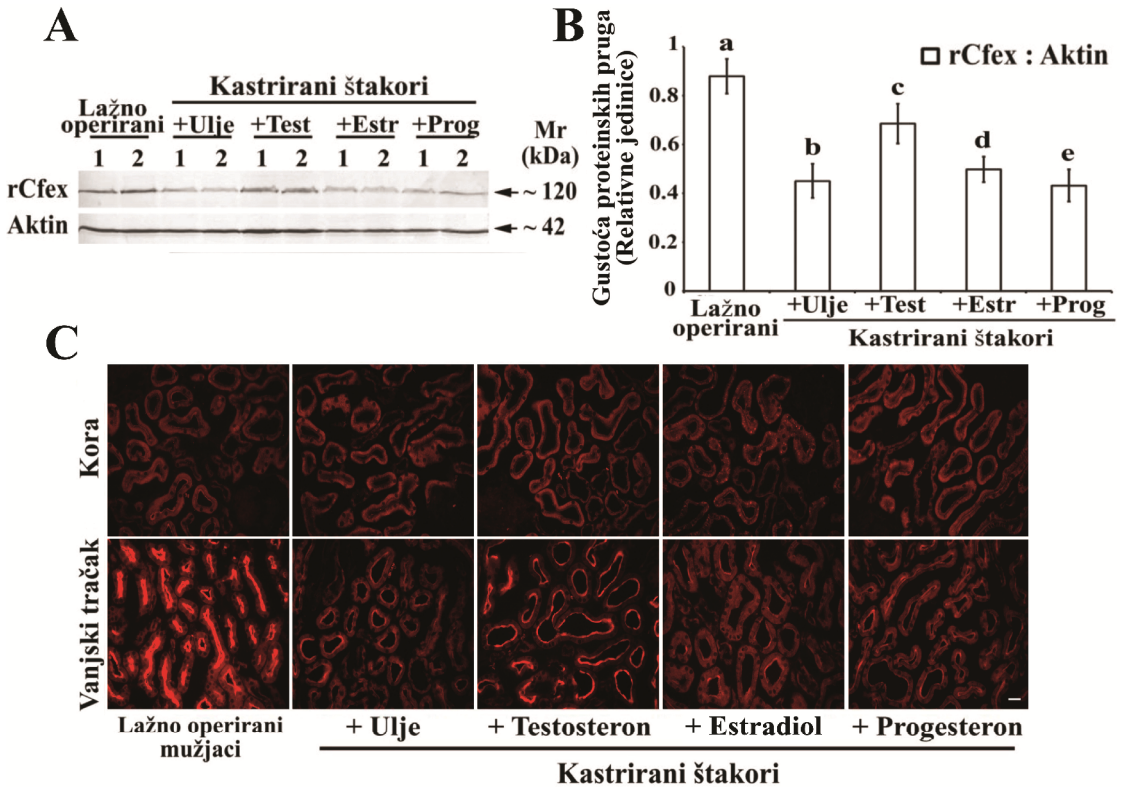
Slika 23. Učinak kastracije na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora. U bubrezima kontrolnih i kastriranih mužjaka provedena je western i imunofluorescencijska analiza protutijelom CFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ*. **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega veća je u kontrolnih mužjaka u odnosu na kastrirane, dok je ekspresija proteina aktina (~42 kDa), koji je korišten kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina, podjednaka u svim ispitanim uzorcima. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega kontrolnih mužjaka je ~1,8 puta veća u odnosu na kastrirane mužjake, dok je gustoća proteinskih pruga za aktin (~42 kDa) podjednaka u obje pokusne skupine. Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na gustoću pruge koja je izmjerena u kontrolnog mužjaka s najvećom ekspresijom proteina rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana bubrega (n = 4, kontrolni mužjaci; n = 4, kastrirani mužjaci). **vs.* kontrolni mužjaci, $P < 0,05$. **C. Imunofluorescencijska analiza.** Imunofluorescencijsko bojenje za rCfex u četkastim membranama proksimalnih kanalića (odsječci S1 i S2; kora) sličnog je intenziteta u kontrolnih i kastriranih mužjaka, dok je isto obojenje u odsječcima S3 (vanjski tračak) većeg intenziteta u kontrolnih u odnosu na kastrirane mužjake. Mjera = 20 µm **D. Denzitometrijsko mjerenje intenziteta fluorescencije.** Intenzitet imunofluorescencijskog bojenja četkaste membrane za rCfex u odsječcima S1 i S2 (kora) je sličan u kontrolnih i kastriranih mužjaka (a *vs*. c), dok je intenzitet istog obojenja u odsječcima S3 (vanjski tračak) u kontrolnih mužjaka ~3 puta veći u odnosu na kastrirane mužjake (b *vs.* d). Rezultati su prikazani kao relativna imunofluorescencija za protein rCfex izmjerena u četkastim membranama proksimalnih kanalića u odnosu na jačinu imunofluorescencijskog bojenja u četkastim membranama proksimalnih kanalića odsječaka S3 u kontrolnih mužjaka (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE dobivene mjerenjem 18 područja četkaste membrane iz 3 nezavisne kriosekcije (n = 18; 6 kanalića/kriosekciji). b *vs.* d, $P < 0,05$. G – glomerul, PK-proksimalni kanalići.



Slika 24. Učinak gonadektomije na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora. U bubrezima kontrolnih i ovarijektomiranih ženki provedena je western i imunofluorescencijska analiza protutijelom rCFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ.* **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega kontrolnih i ovarijektomiranih ženki podjednaka je u svim ispitanim uzorcima, kao i ekspresija proteina aktina (~42 kDa) koji je korišten kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega kontrolnih i ovarijektomiranih ženki je slična. Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na gustoću pruge koja je izmjerena u kontrolne ženke s najvećom ekspresijom rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana bubrega (n = 4, kontrolne ženke; n = 4, ovarijektomirane ženke). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Imunofluorescencijsko bojenje za rCfex u četkastim membranama odsječaka S1 i S2 (kora) i odsječaka S3 (vanjski tračak) sličnog je intenziteta u kontrolnih i ovarijektomiranih ženki. Mjera = 20 µm. **D. Denzitometrijsko mjerenje intenziteta fluorescencije.** Intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama odsječaka S1 i S2 (kora) i odsječaka S3 (vanjski tračak) je sličan u kontrolnih i ovarijektomiranih ženki (a *vs.* c i b *vs.* d). Rezultati su prikazani kao relativna imunofluorescencija za protein rCfex izmjerena u četkastim membranama proksimalnih kanalića u odnosu na jačinu imunofluorescencijskog bojenja u četkastim membranama proksimalnih kanalića odsječaka S3 u ovarijektomiranih ženki (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE dobivene mjerenjem 18 područja četkaste membrane iz 3 nezavisne kriosekcije (n = 18; 6 kanalića/kriosekciji). G – glomerul, PK – proksimalni kanalići.

4.5.1.3. *Učinak spolnih hormona na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora*

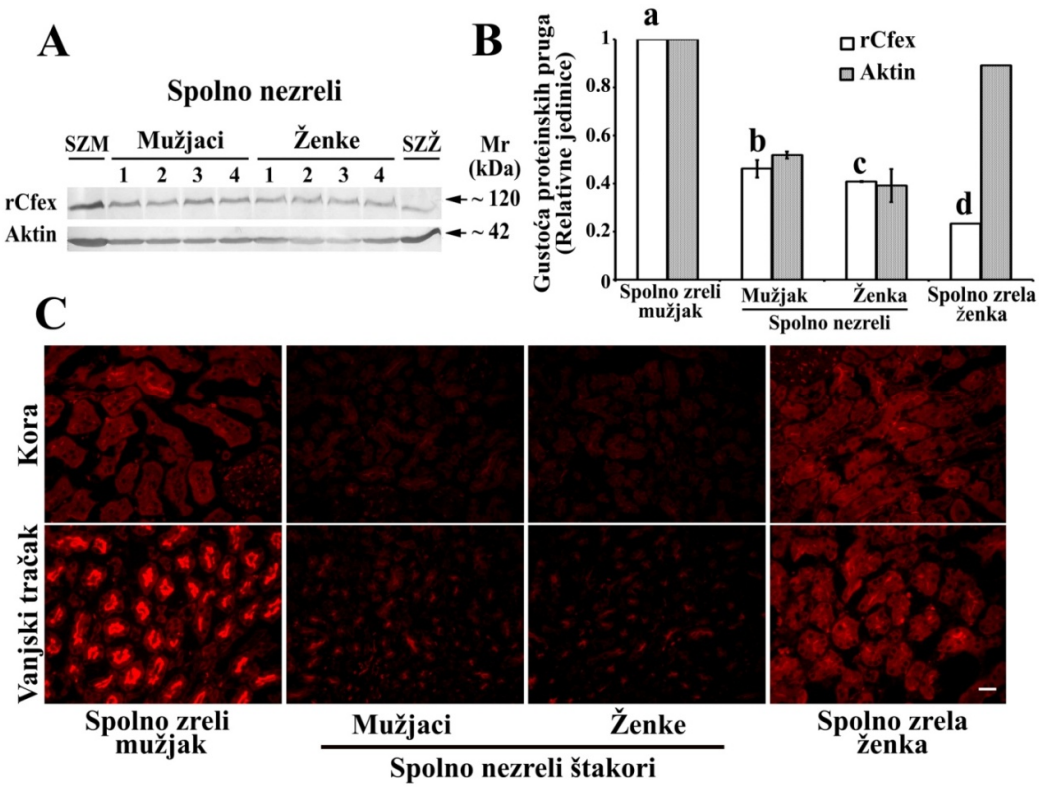
Nakon što je uočen inhibitorni učinak kastracije na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima mužjaka, ispitani su učinci triju spolnih hormona uključujući testosteron, estradiol i progesteron na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima kastriranih mužjaka. Kao što je prikazano na **Slici 25**, kastrirani mužjaci su tretirani suncokretovim uljem (+Ulje, kontrola), testosteronom (+Test), estradiolom (+Estr) i progesteronom (+Prog) prema opisu u poglavlju 3.2.2. Rezultati western analize su pokazali da testosteron stimulira ekspresiju proteina rCfex u bubrezima kastriranih mužjaka (**Slika 25A**, +Test). Za razliku od stimulacijskog učinka testosterona, estradiol i progesteron nisu mijenjali ekspresiju proteina rCfex u bubrezima kastriranih mužjaka (**Slika 25A**, +Estr i +Prog). Točnije, gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) se smanjila kastracijom za 51% (**Slika 25B**, a *vs.* b) i povećala za 52% u kastriranih mužjaka tretiranih testosteronom (**Slika 25B**, b *vs.* c), a nije se mijenjala u kastriranih mužjaka tretiranih estradiolom (**Slika 25B**, b *vs*. d) i progesteronom (**Slika 25B**, b *vs*. e). Slični rezultati dobiveni su metodom imunofluorescencijske analize; kastracija je smanjila intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama proksimalnih kanalića u vanjskom tračku (odsječci S3) (Slika **25C**, +Ulje), a testosteron je povećao intenzitet istog bojenja (**Slika 25C**, +Test). Za razliku od testosterona, estradiol (**Slika 25C**, +Estr) i progesteron (**Slika 25C**, +Prog) nisu mijenjali intenzitet bojenja za rCfex istih staničnih struktura u bubrezima kastriranih mužjaka. Intenzitet bojenja za protein rCfex u četkastoj membrani proksimalnih kanalića kore (odsječci S1 i S2) nije se mijenjao u bubrezima kastriranih mužjaka tretiranih spolnim hormonima. Dakle, u kastriranih mužjaka uočen je jaki stimulacijski učinak testosterona na ekspresiju proteina rCfex u proksimalnim kanalićima vanjskog tračka bubrega (odsječci S3), dok se njegova ekspresija nije mijenjala pod utjecajem estradiola i progesterona.



Slika 25. Učinci spolnih hormona: testosterona, estradiola i progesterona na ekspresiju proteina rCfex u bubrezima kastriranih mužjaka. U bubrezima kontrolnih, tj. lažno operiranih (LO) i kastriranih mužjaka koji su tretirani suncokretovim uljem (U) i spolnim hormonima provedena je western i imunofluorescencijska analiza protutijelom CFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ.* **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) najveća je u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega kontrolnih, nešto niža u kastriranih mužjaka tretiranih testosteronom (T), dok je podjednako niska u kastriranih mužjaka tretiranih suncokretovim uljem (U), estradiolom (E) i progesteronom (P) (LO > T > U = E = P). Ekspresija proteina aktina (~42 kDa), koji je korišten kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina je različita, pa je tijekom denzitometrijske analize rabljen omjer gustoće proteinskih pruga proteina rCfex:aktin. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Omjer gustoće proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) i aktin (~42 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega kontrolnih mužjaka je ~2 puta veći nego li u kastriranih mužjaka tretiranih uljem, estradiolom i progesteronom, a ~1,3 puta veći nego u kastriranih mužjaka tretiranih testosteronom (a > c > b = d = e). Stupci prikazuju omjer gustoće proteinskih pruga u odnosu na omjer gustoće pruge izmjeren u kontrolnog mužjaka koji ukazuje na najveću ekspresiju proteina rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana bubrega (n = 4, za svaku skupinu životinja. (a > b, c, d, e ; c > b, d,e; P < 0,05; b = d = e). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Imunofluorescencijsko bojenje za rCfex najjačeg je intenziteta u četkastim membranama proksimalnih kanalića odsječaka S3 (vanjski tračak) u lažno operiranih mužjaka, nešto slabijeg intenziteta u kastriranih mužjaka tretiranih testosteronom, a vrlo slabog intenziteta u kastriranih mužjaka tretiranih suncokretovim uljem, estradiolom i progesteronom (LO > T > U = E = P). U četkastim membranama odsječaka S1 i S2 (kora), intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex je sličan u svim pokusnim skupinama. Mjera = 20 µm.

4.5.1.4. *Ekspresija proteina rCfex u bubrezima spolno nezrelih štakora*

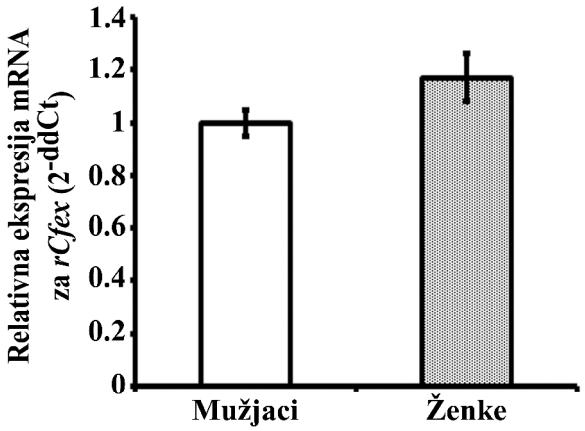
Kako bi utvrdili ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora prije postizanja spolne zrelosti, ispitana je ekspresija proteina rCfex u bubrezima spolno nezrelih (predpubertetskih) štakora oba spola starosti 26 dana (**Slika 26**). Kao kontrolne skupine rabljeni su uzorci bubrega spolno zrelih životinja oba spola starosti 3 mjeseca. Rezultati western analize pokazali su da je ekspresija proteina rCfex u bubrezima spolno nezrelih životinja slična (**Slika 26A i B,** rCfex: b *vs*. c), te da je slabija od one opažene u spolno zrelih mužjaka (**Slika 26A i B,** rCfex: (b≈c) *vs*. a), a slična onoj u spolno zrelih ženki (**Slika 26A i B,** rCfex: (b≈c) *vs*. d). Slični rezultati dobiveni su metodom imunofluorescencijske analize; imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u četkastim membranama proksimalnih kanalića kore i vanjskog tračka sličnog je intenziteta u spolno nezrelih mužjaka i ženki **(Slika 26C**). Isto obojenje vidljivo u proksimalnih kanalićima vanjskog tračka u bubrezima spolno nezrelih životinja je slabijeg intenziteta od onog u spolno zrelog mužjaka, ali sličnog intenziteta onome u spolno zrele ženke (**Slika 26C**). Dobiveni rezultati imunokemijskih analiza pokazuju da ekspresija proteina rCfex nije ovisna o spolu u spolno nezrelih životinja, te da je slična onoj u spolno zrelih ženki, a manja u odnosu na onu otkrivenu u spolno zrelih mužjaka. Dakle, spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora, koje su opisane u poglavljima 4.5.1.1. - 4.5.1.3, nastaju uslijed stimulacijskog učinka testosterona nakon puberteta.



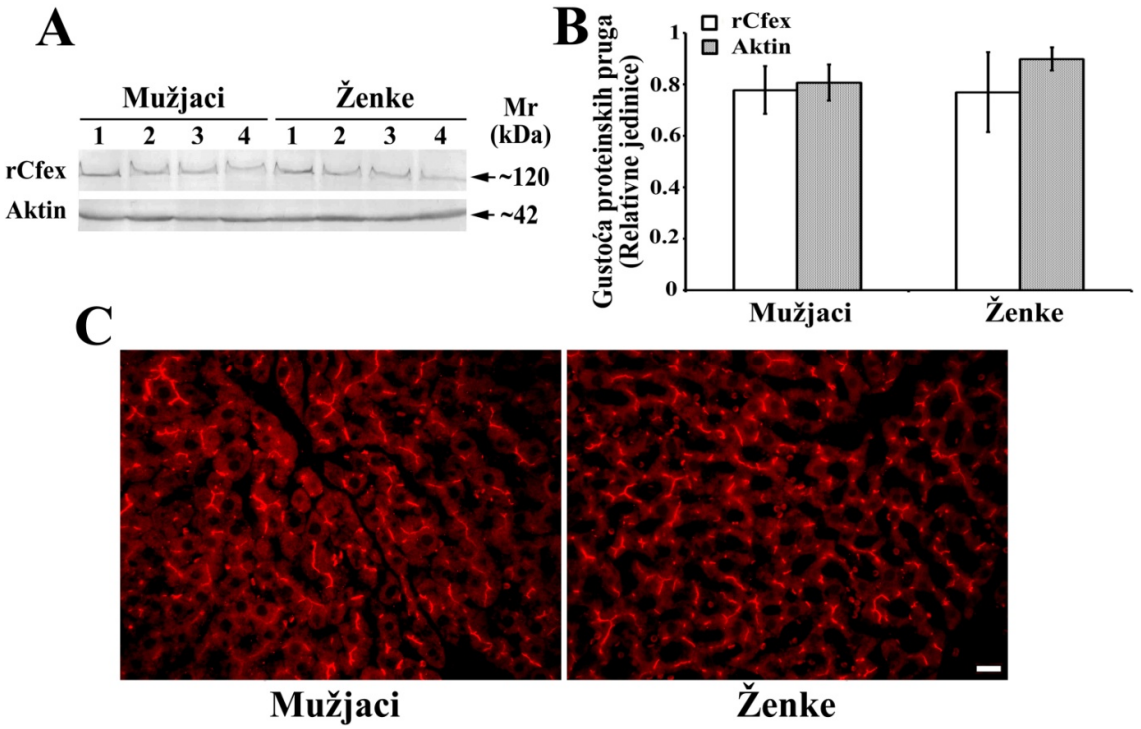
Slika 26. Ekspresija proteina rCfex u bubrezima spolno nezrelih štakora. U bubrezima spolno nezrelih i zrelih štakora oba spola provedena je western i imunofluorescencijska analiza protutijelom CFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ* **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega podjednaka je u spolno nezrelih štakora oba spola, ali je niža u odnosu na spolno zrelog mužjaka (SZM), a viša u odnosu na spolno zrele ženke (SZŽ) (SZM > SNM = SNŽ > SZŽ). Ekspresija proteina aktina (~42 kDa), koji je poslužio kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina, podjednaka je u svim ispitanim uzorcima. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz bubrega spolno nezrelih štakora oba spola je podjednaka (b=c). Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na gustoću pruge izmjerene u spolno zrelog mužjaka koji je imao najveću ekspresiju proteina rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana bubrega (n = 4, spolno nezreli mužjaci; n = 4, spolno nezrele ženke). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama odsječaka S1 i S2 (kora) i odsječaka S3 (vanjski tračak) je sličan u spolno nezrelih mužjaka i ženki. U usporedbi sa spolno nezrelim životinjama, identično bojenje u četkastim membranama S3 odsječaka (vanjski tračak) kod spolno zrelog mužjaka je jačeg intenziteta dok je slabijeg intenziteta u spolno zrele ženke. Mjera = 20 µm.

4.5.2. Ekspresija mRNA i proteina rCfex u jetri spolno zrelih štakora

Rezultati analize qRT-PCR-a pokazali su da ekspresija mRNA za *rCfex* nije ovisna o spolu u jetri spolno zrelih štakora. Drugim riječima, u jetri spolno zrelih štakora, ekspresija mRNA za *rCfex* slična je u mužjaka i ženki (**Slika 27**). Ekspresija konstitutivno izraženog gena za *β-aktin*, upotrebljavanog za normalizaciju količine cDNA, bila je podjednaka u jetri spolno zrelih štakora oba spola (rezultati nisu prikazani). Rezultati western i imunofluorescencijske analize su također pokazali da ekspresija proteina rCfex nije ovisna o spolu u jetri spolno zrelih štakora (**Slika 28**). Tako je ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) i aktina (~42 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz jetre slična u mužjaka i ženki (**Slika 28A i B**). Također, imunofluorescencijsko bojenje za rCfex u kanalikularnim membrana hepatocita je sličnog intenziteta u spolno zrelih mužjaka i ženki (**Slika 28C**). Dakle, u jetri spolno zrelih štakora, ekspresija rCfex na razini mRNA i proteina slična je u mužjaka i ženki, tj. nije ovisna o spolu.



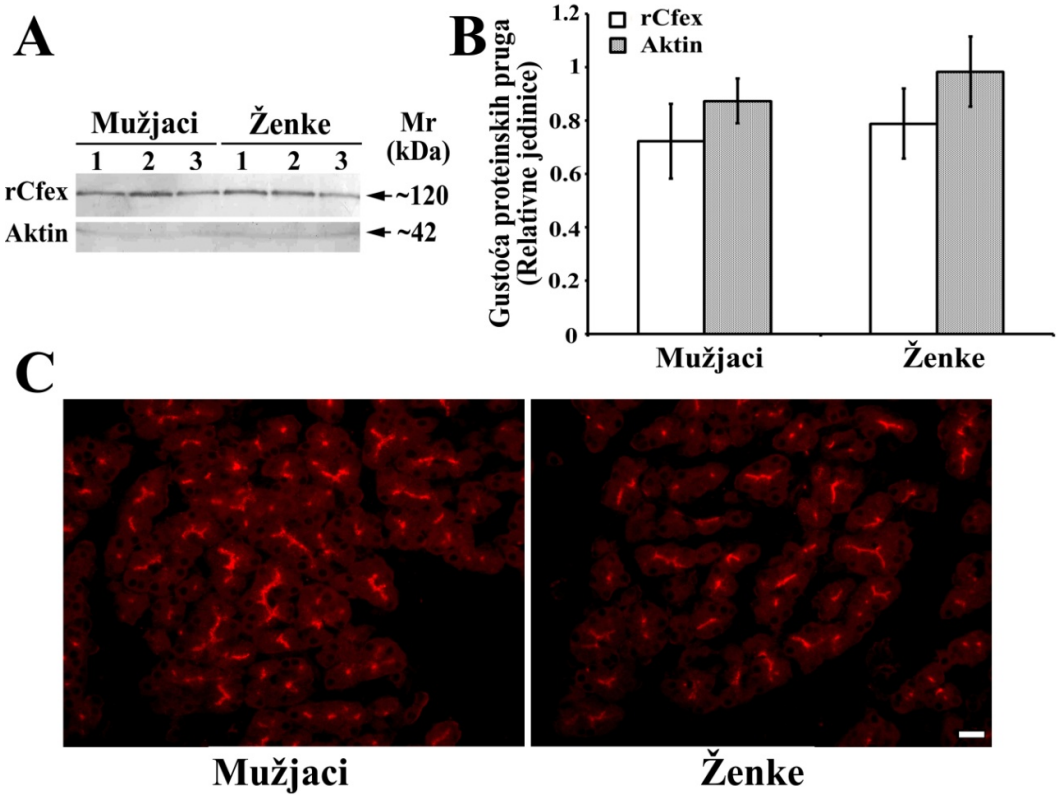
Slika 27. Ekspresija mRNA za *rCfex* u jetri spolno zrelih štakora; usporedba mužjaka i ženki, qRT-PCR. Iz jetre spolno zrelih štakora oba spola (starosti 3 mjeseca) izdvojena je ukupna stanična RNA i sintetizirana cDNA. Reakcijom qRT-PCR izmjerena je relativna ekspresija mRNA za *rCfex* koja je normalizirana prema endogenoj kontroli *β-aktin* i analizirana komparativnom 2^{-ddCt} metodom. Ekspresija mRNA za *rCfex* u jetri spolno zrelih štakora podjednaka je u mužjaka i ženki. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija mRNA za *rCfex* u odnosu na ekspresiju mRNA za *rCfex* izmjerenu u jetri mužjaka s najvećom razinom ekspresije mRNA za *rCfex* (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz četiri nezavisna uzorka ukupne stanične RNA (n = 4, mužjaci; n = 4, ženke). Ekspresija mRNA za *β-aktin* (endogena kontrola) podjednaka je u jetri spolno zrelih štakora oba spola (rezultati nisu prikazani).



Slika 28. Ekspresija proteina rCfex u jetri spolno zrelih štakora; usporedba mužjaka i ženki. U jetri spolno zrelih štakora (starosti 3 mjeseca) oba spola provedena je western i imunofluorescencijska analiza protutijelom CFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ* **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz jetre slična je u spolno zrelih štakora oba spola. Ekspresija proteina aktina (~42 kDa), koji je korišten kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina, podjednaka je u svim ispitanim uzorcima oba spola. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) i aktin (~42 kDa) slična je u oba spola. Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na prugu koja je izmjerena u mužjaka s najvećom ekspresijom rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 4 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana jetre (n = 4, mužjaci; n = 4, ženke). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Imunofluorescencijsko bojenje za rCfex u kanalikularnim membranama hepatocita sličnog je intenziteta u oba spola. Mjera = 20µm.

4.5.3. Ekspresija proteina rCfex u gušterači spolno zrelih štakora

Rezultati imunokemijske analize, koji uključuju western i imunofluorescencijsku analizu, su pokazali da ekspresija proteina rCfex nije ovisna o spolu u gušterači spolno zrelih štakora (**Slika 29**). Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) i aktina (~42 kDa), koji je služio kao kontrola unosa količine proteina, bila je podjednaka u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz gušterače štakora oba spola (**Slika 29A i B**). Sukladno tome, rezultati imunofluorescencijske analize su potvrdili da je intenzitet bojenje za rCfex u apikalnim domenama izvodnih kanalića gušterače sličan u mužjaka i ženki (**Slika 29C**). Dakle, u gušterači spolno zrelih štakora, ekspresija proteina rCfex nije ovisna o spolu.



Slika 29. Ekspresija proteina rCfex u gušterači štakora; usporedba mužjaka (M) i ženki (Ž). U gušterači spolno zrelih štakora (starosti 3 mjeseca) oba spola provedena je western i imunofluorescensijska analiza protutijelom CFEX-Ab, pri čemu su gustoće proteinskih pruga i intenzitet imunofluorescencijskog bojenja izmjereni računalnim programom *ImageJ* **A. Western analiza.** Ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz gušterače podjednaka je u spolno zrelih mužjaka i ženki. Ekspresija proteina aktina (~42 kDa), koji je korišten kao kontrola ujednačenog nanošenja proteina, podjednaka je u svim ispitanim uzorcima. Masa proteina iznosila je 80 µg/jažici. **B. Denzitometrijsko mjerenje gustoće proteinskih pruga.** Gustoća proteinskih pruga za rCfex (~120 kDa) i aktin (~42 kDa) je podjednaka u oba spola. Stupci prikazuju gustoću proteinskih pruga u odnosu na prugu koja je izmjerena u mužjaka s najvećom ekspresijom rCfex (= 1). Prikazane su srednje vrijednosti ± SE iz 3 nezavisna uzorka ukupnih staničnih membrana gušterače (n = 3, mužjaci; n = 3, ženke). **C. Imunofluorescencijska analiza.** Imunofluorescencijsko bojenje za rCfex u apikalnim domenama izvodnih kanalića gušterače sličnog je intenziteta u oba spola spolno zrelih štakora. Mjera = 20 µm.

5. RASPRAVA

U ovom doktorskom radu je metodama klasičnog i qRT-PCR-a istražena ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim tkivima/organima štakora koji se učestalo rabe kao pokusne životinje u mnogobrojnim pato/fiziološkim, farmakološkim i toksikološkim istraživanjima. Specifičnost rabljenog protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) ispitana je i potvrđena imunofluorescencijskom analizom u heterolognom ekspresijskom sustavu u kojemu su stanice HEK293 transfecirane cjelovitom cDNA za *rCfex*. Upotrebom specifičnog protutijela CFEX–Ab tijekom imunokemijske analize opisana je precizna stanična lokalizacija i ekspresija proteina rCfex u različitim tkivima/organima štakora u kojima je detektirana ekspresija mRNA za *rCfex*. Metodama qRT-PCR-a, western i imunofluorescencijske analize otkrivene su spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora koje se javljaju nakon puberteta uslijed stimulacijskog učinka testosterona.

Nadalje, metodom klasičnog RT-PCR-a utvrđena je ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim organima/tkivima štakora soja Wistar. U tu svrhu izdvojena je ukupna stanična RNA iz bubrega, jetre, gušterače, želuca, tankog crijeva uključujući dvanaesnik, tašto, vito i slijepo crijevo, te debelog crijeva. Sve izdvojene RNA iz ispitanih tkiva/organa bile su cjelovite i visoke čistoće zadovoljavajući preduvjete za daljnju analizu ekspresije gena metodama klasičnog i qRT-PCR-a. Efikasnost reakcije RT, tj. sinteza cDNA provjerena je reakcijom klasičnog PCR-a u kojem su umnažani odsječci cDNA dvaju konstitutivno eksprimiranih *housekeeping* gena: *rβ-aktina* ili *rHprt1*. U sintetiziranim uzorcima cDNA umnoženi su specifični odsječci cDNA za *rβ-aktin* ili *rHprt1,* ukazujući na uspješnost sinteze cDNA u svim ispitanim tkivima/organima štakora. Nakon provjere efikasnosti sinteze cDNA, reakcijom PCR umnažani su odsječci cDNA za *rCfex* u različitim tkivima/organima štakora. Dizajn početnica za umnažanje odsječka cDNA za *rβ-aktin* opisan je ranije u radu Breljak i sur., 2010., a početnice za umnažanje odsječaka cDNA za *rHprt1* i *rCfex* dizajnirane su na isti način pomoću računalnog programa *Primer 3* u skladu s principima koji se primjenjuju tijekom dizajniranja početnica (Abd-Elsalam, 2003.; Ye i sur., 2012.). Kako bi se spriječilo moguće umnažanje genomske DNA, parovi početnica za specifične gene dizajnirani su tako da su uzvodne i nizvodne početnice homologne slijedovima nukleotida smještenim na dva različita egzona istraživanih gena. Nadalje, specifičnost dizajniranih početnica za *rCfex* potvrđena je sekvenciranjem odsječka cDNA za *rCfex* iz bubrega štakora koji je umnožen tijekom reakcije PCR. Rezultati sekvenciranja nedvojbeno ukazuju da je par početnica za

rCfex specifičan, te se može rabiti u daljnim analizama ekspresije mRNA za *rCfex* u različitim tkivima/organima štakora.

Prema rezultatima klasičnog RT-PCR-a prikazanim u ovom doktorskom radu, ekspresija mRNA za *rCfex* utvrđena je u bubrezima, tankom crijevu (dvanaesnik, tašto i vito crijevo), jetri i gušterači štakora, dok ista nije detektirana u želucu, slijepom i debelom crijevu. Dosadašnja objavljena istraživanja uglavnom opisuju ekspresiju mRNA za *CFEX/Cfex* u različitim tkivima/organima u miševa i čovjeka (Alvarez i sur., 2004.; Knauf i sur., 2001.; Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.; Petrović i sur., 2003a.; Waldegger i sur., 2001.; Wang i sur., 2002., 2005.; Xie i sur., 2002.), dok su slični podaci u štakora malobrojni (Gholami i sur., 2012.; Petrović i sur., 2003b.). Dobiveni rezultati RT-PCR analize sukladni su rezultatima Petrović i sur. (2003b.) u kojima je mRNA za *rCfex* detektirana u bubrezima štakora northern analizom. Također, u bubrezima miševa i čovjeka utvrđena je ekspresija mRNA za *CFEX/mCfex* metodama northern i RT-PCR analize (Lohi i sur., 2000.; Petrović i sur., 2003a.; Waldegger i sur., 2001.; Xie i sur., 2002.), što ukazuje na sličnost ekspresije mRNA za *CFEX/Cfex* u bubrezima različitih vrsta (lat. *species)* kao što su glodavci (miševi i štakori) i ljudi. Nadalje, ekspresija mRNA za *rCfex* istražena je metodama klasičnog i qRT-PCR-a u različitim dijelovima gastrointestinalne/probavne cijevi štakora. Tako je u ovom doktorskom radu po prvi puta pokazano da je razina ekspresije mRNA za *rCfex* najveća u dvanaesniku, nešto niža u taštom crijevu i vrlo mala u vitom crijevu. Prema objavljenim literaturnim podacima trenutno nema podataka koji opisuju ekspresiju mRNA za *rCfex* u probavnoj cijevi štakora i čovjeka. Drugim riječima, u ovom doktorskom radu po prvi puta su opisane zonske razlike u ekspresiji mRNA za *rCfex* uzduž tankog crijeva štakora (dvanaesnik > tašto crijevo > vito crijevo). Suprotno tome, u želucu, slijepom i debelom crijevu štakora, ekspresija mRNA za *rCfex* nije detektirana. Sličan uzorak ekspresije mRNA za *mCfex* u različitim zonama tankog crijeva miševa (dvanaesnik > tašto crijevo > vito crijevo), te odsutnost njegove ekspresije u slijepom i debelom crijevu miševa detektirana je northern analizom (Wang i sur., 2002.). No, za razliku od štakora, ekspresija mRNA za *mCfex* pronađena je u želucu miševa metodama northern i RT-PCR analize (Petrović i sur., 2003a.; Wang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.), upućujući na drugačiji profil ekspresije mRNA za *Cfex* uzduž gastrointestinalne/probavne cijevi između različitih vrsta kao što su miševi i štakori. Osim u probavnoj cijevi, u ovom doktorskom radu je metodom klasičnog RT-PCR-a po prvi puta opisana ekspresija mRNA za *rCfex* u jetri i gušterači štakora. Ekspresija mRNA za *rCfex* u navedenim organima očekivana je sukladno već objavljenim rezultatima northern i RT-PCR

analiza koje pokazuju ekspresiju mRNA za *mCfex* u jetri miševa (Knauf i sur., 2001.; Petrović i sur., 2003a.), te mRNA za *CFEX* u jetri i gušterači čovjeka (Lohi i sur., 2000.; Waldegger i sur., 2001.). Za razliku od čovjeka (Lohi i sur., 2000.) i štakora (u ovom radu), ekspresija mRNA za *mCfex* u gušterači miševa još uvijek nije detektirana iako je u izvodnim kanalićima gušterače miševa *Cfex* KO uočena promjena u izlučivanju bikarbonatnog iona (Wang i sur., 2006.).

U ovom doktorskom radu rabljeno je komercijalno poliklonsko protutijelo CFEX-Ab (sc-26728; C17) kako bi se ispitala ekspresija i stanična lokalizacija proteina rCfex u različitim tkivima/organima štakora imunokemijskim metodama uključujući imunofluorescencijsku i western analizu. Poliklonsko protutijelo CFEX-Ab proizvedeno je u kozi (*Capra hircus*) upotrebom imunizacijskog peptida čiji je slijed aminokiselinskih ostataka identičan slijedu na C-kraju proteina CFEX u čovjeka. Prema preporuci proizvođača, protutijelo CFEX-Ab može se koristiti za detekciju proteina CFEC/Cfex u čovjeka, miševa i štakora metodama western i imunofluorescencijske analize. Također, može se koristiti za detekciju proteina Cfex u ostalim vrstama uključujući psa, goveda i svinje (Chávez i sur., 2012.; Hassan i sur., 2012.; Pierucci-Alves i sur., 2011.) (http://datasheets.scbt.com/sc-26728.pdf.). Isto protutijelo rabljeno je u prethodnim imunokemijskim analizama estrusnog ciklusa u maternici štakora, ali njegova specifičnost nije ispitana (Gholami i sur., 2012.). Naime, na tržištu postoji mnoštvo protutijela koja se, osim na specifičan protein, mogu nespecifično vezati i na druge proteine, te stoga nisu prikladna za imunokemijske analize. Stoga je neophodno ispitati/provjeriti specifičnost svakog protutijela prije upotrebe u imunokemijskim analizama (Baker, 2015.; Bordeaux i sur., 2010.; Bradbury i Plückthun, 2015.; Saper, 2009.). Najbolji način za provjeru specifičnosti protutijela je upotreba modela KO miševa u kojima je inaktiviran specifičan gen (koji kodira za specifičan protein). No, kako modeli odgovarajućih KO miševa nisu uvijek dostupni, za provjeru specifičnosti protutijela koriste se vrlo pouzdane alternativne metode koje uključuju transfekciju staničnih linija sa cDNA specifičnih gena (Baker, 2015.; Bordeaux i sur., 2010.; Saper, 2009.).

U ovom istraživanju specifičnost protutijela CFEX-Ab (sc-26728) ispitana je pomoću heterolognog ekspresijskog sustava u kojemu su stanice HEK293 transfecirane sa cDNA za *rCfex*. U tu svrhu je najprije cjelovita cDNA za *rCfex* uklonirana u plazmidni vektor pcDNA^{TM}3.1/HisC kojime su potom stanice HEK293 prolazno transfecirane. Postupak kloniranja proveden je prema standardnoj proceduri (Sambrook i sur., 1989.) korištenoj u nizu

dosadašnjih istraživanja (Jordan i sur., 1996.; Popović i sur., 2013.; Sambrook i Russell, 2006.; Venter i sur., 2001.). Izdvojena ukupna stanična RNA iz bubrega štakora poslužila je kao kalup za sintezu cDNA iz koje je odsječak cjelovite cDNA za *rCfex* umnožen reakcijom PCR upotrebom specifičnih početnica za gen *rCfex* i DNA polimeraze *Phusion High-Fidelity*. Pritom je spomenuta DNA polimeraza zbog svoje 3' → 5' egzonukleazne aktivnosti osigurala veliku točnost umnažanja cjelovite cDNA za *rCfex* (Ishino i Ishino, 2014.; Wang i sur., 2004.). Cjelovita cDNA za *rCfex* klonirana je u plazmid pJET1.2/blunt kojim su transformirane bakterijske stanice *E. coli* soja DH5α (Hoseini i Sauer, 2015.; Popović i sur., 2013.). Uz prisutnost antibiotika ampicilina, transformirane bakterijske stanice na krutoj podlozi formiraju kolonije (Hoseini i Sauer, 2015.) koje su rabljene kao kalup (engl. *template*) tijekom reakcije PCR u kojoj je umnožen odsječak cDNA za *rCfex*. Potom su transformirane bakterijske stanice umnožene kako bi se iz njih izdvojila dovoljna količina rekombinantnog plazmida pJET1.2/blunt.

Kako bi utvrdili slijed nukleotida cDNA za *rCfex* koja je klonirana u rekombinantni plazmid pJET1.2/blunt, isti je sekvenciran upotrebom 6 oligonukleotidnih početnica (**Tablica 9**). Sekvenciranje i sravnjivanje dobivenih sljedova nukleotida sa sljedom nukleotida gena *rCfex* potvrdilo je da je cjelovita cDNA za *rCfex* uspješno klonirana u plazmidni vektor pJET1.2/blunt. Potom je konstruiran rekombinantni plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC koji se rabi za transfekciju stanica sisavaca (https://www.thermofisher.com). Odsječak cDNA za *rCfex* izdvojen je iz plazmida pJET1.2/blunt korištenjem dvije kombinacije restrikcijskih enzima (*EcoRI/ApaI* ili *NheI/ApaI*) što je omogućilo konstruiranje dva različita rekombinantna plazmida pcDNA^{TM}3.1/HisC za transfekciju stanične linije HEK293. Rekombinantni plazmid, obrađen kombinacijom enzima *EcoRI/ApaI* je uz odsječak cDNA za *rCfex* posjedovao biljege poliHis i Xpress, dok je drugi plazmid obrađen enzimima *NheI/ApaI* sadržavao samo odsječak cDNA za *rCfex*. Oba rekombinantna plazmida su potom korištena za prolaznu transfekciju stanica HEK293 pomoću kemijskog agensa PEI. Transfekcija stanica sisavaca u kojoj se koristi PEI, u literaturi se opisuje kao vrlo efikasan, jednostavan i netoksičan postupak za stanice (Boussif, 1995.; Boussif i sur., 1996.; Jäger i sur., 2013.; Thomas i Klibanov, 2002.; Tom i sur., 2008.). Biljezi poliHis i Xpress, koji služe kao način praćenja ekspresije proteina kloniranog gena u heterolognim ekspresijskim sustavima (Lee i sur., 2011.; Pogačić i sur., 2000.; Popović i sur., 2013.), poslužili su kao dodatan način detekcije proteina rCfex u stanicama HEK293 transfeciranim rekombinantnim plazmidima s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*. Poznato je da takvi biljezi mogu utjecati na strukturu i funkciju proteina na

kojeg su vezani (Carson i sur., 2007.; Chant i sur., 2005.; Halliwell i sur., 2001.; Ledent i sur., 1997.; Majorek i sur., 2014.) što za posljedicu može imati smanjenu mogućnost ili potpunu nesposobnost vezanja protutijela specifičnog za drugi epitop na istom proteinu. Stoga su konstruirana dva rekombinantna plazmida kako bi se korištenjem protutijela za biljege (anti-His i/ili anti-Xpress) i protutijela za specifični epitop na proteinu rCfex (CFEX-Ab) uspješno detektirala ekspresija proteina rCfex u stanicama HEK293 koje su prolazno transfecirane sa cDNA za *rCfex.*

Dakle, specifičnost protutijela CFEX-Ab ispitana je imunofluorescencijskom analizom usporedbom stanica HEK293 transfeciranih rekombinantnim plazmidom s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* i kontrolnih stanica HEK293 transfeciranih plazmidom koji ne sadrži cDNA za *rCfex*. Protutijelo CFEX-Ab obojilo je staničnu membranu stanica HEK293 transfeciranih rekombinantnim plazmidom s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*, dok je imunofluorescencijsko bojenje za rCfex bilo odsutno u kontrolnih stanica HEK293. Na sličan je način heterologni ekspresijski sustav HEK293 rabljen kako bi se ispitala specifičnost protutijela za proteine SLC13A3, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8, SLC7A10, histaminski H4 receptor i TRPM2 (engl. *Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 2*) i (Beermann i sur., 2012.; Breljak i sur., 2016.; Helboe i sur., 2003.; Sun i sur., 2012.). Specifičnost protutijela za detekciju proteina CFEX/mCfex u čovjeka i miševa u prethodnim istraživanjima provjerena je korištenjem različitih heterolognih ekspresijskih sustava poput staničnih linja HEK293, COS-1 i COS-7 (engl. *CV-1 in Origin with SV40 genes*) (Alvarez i sur., 2004.; Knauf i sur., 2001.; Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.). Dobiveni rezultati imunofluorescencijske analize u ovom doktorskom radu upućuju na specifično vezanje protutijela CFEX-Ab na epitop proteina rCfex. Stoga se komercijalno poliklonsko protutijelo CFEX-Ab može rabiti za daljnja istraživanja stanične lokalizacije i ekspresije proteina rCfex u različitim tkivima/organima štakora.

Nakon što je potvrđena specifičnost protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab), istražena je stanična lokalizacija (imunofluorescencijskom analizom) i ekspresija proteina (western analizom) rCfex u tkivima/organima štakora u kojima je utvrđena ekspresija mRNA za *rCfex* metodom klasičnog RT-PCR-a. Slično rezultatima koji opisuju ekspresiju mRNA za *rCfex,* trenutno u objavljenoj literaturi ne postoji mnogo podataka o staničnoj lokalizaciji i ekspresiji proteina rCfex u različitim tkivima/organima štakora. Kako bi se tijekom imunofluorescencijske analize otkrili epitopi za vezanje protutijela CFEX-Ab, ispitane su različite metode otkrivanja antigena koje je neophodno provesti za utvrđivanje

optimalnih uvjeta u kojima je imunofluorescencijsko bojenje za rCfex najjačeg intenziteta (Brzica i sur., 2009b., 2011.). Za sva ispitana tkiva i organe, optimalni uvjeti otkrivanja antigena uključivali su obradu tkivnih narezaka s deterdžentima te kuhanje u citratnom puferu pH 6. Također, kako bi se pronašli optimalni uvjeti za detekciju proteina rCfex tijekom western analize, proteini iz ukupnih staničnih membrana različitih tkiva/organa denaturirani su u nereducirajućim ili reducirajućim uvjetima pri različitim temperaturama kao što je opisano u Breljak i sur., (2010.). Za sva ispitana tkiva i organe, optimalni uvjeti western analize uključivali su denaturaciju proteina u reducirajućim uvjetima (u prisustvu β-merkaptoetanola) pri različitim temperaturama (37°C/30 min, 65°C/15 min i 95°C/5 min). Nakon pronalaženja optimalnih uvjeta za otkrivanje epitopa, upotrebom specifičnog protutijela CFEX-Ab provedena je detaljna imunofluorescencijska i western analiza u tkivima/organima štakora u kojima je klasičnim RT-PCR-om detektirana mRNA za *rCfex*.

U bubrezima štakora, protein rCfex imunolokaliziran je u BBM proksimalnih kanalića smještenih u kori (odsječci S1 i S2) i vanjskom tračku (odsječci S3). U ostalim dijelovima nefrona, uključujući unutarnji tračak i papilu, protein rCfex nije pronađen. Uočeno imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex u potpunosti je izostalo u bubrezima (ali i ostalim ispitanim tkivima/organima) upotrebom protutijela CFEX-Ab koje je blokirano specifičnim imunizirajućim peptidom. Imunofluorescencijska analiza utvrdila je da je intenzitet bojenja BBM proksimalnih kanalića smještenih u vanjskom tračku ~6,8 puta (mužjaci) i ~2 puta (ženke) jači u odnosu na one smještene u kori bubrega, upućujući na segmentalne ((S1 ≈ S2) < S3) i zonalne (kora < vanjski tračak) razlike u ekspresiji proteina rCfex u bubrezima štakora. Suprotno tome, u ženkama štakora soja Sprague-Dawley uočena je drugačija distribucija proteina rCfex duž nefrona; protein rCfex imunolokaliziran je u BBM proksimalnih kanalića kore, ali ne i u BBM proksimalnih kanalića vanjskog tračka (Petrović i sur., 2003b.). No, treba napomenuti da su rezultati dobiveni u tom istraživanju posljedica korištenja protutijela čija se specifičnost opisivala odsutnošću imunofluorescencijskog bojenja u bubrezima štakora nakon blokade protutijela peptidom (Petrović i sur., 2002., 2003b.) i odsutnošću imunofluorescencijskog bojenja u dvanaesniku miševa *Cfex* KO (Wang i sur., 2002., 2005.). No, dosadašnja istraživanja pokazuju da blokada vezanja protutijela pomoću imunizacijskog peptida nije siguran način utvrđivanja specifičnosti protutijela, već se u tu svrhu preporuča korištenje heterolognih ekspresijskih sustava (npr. stanice HEK293, COS-1, COS-7, MDCK i oocite *X. laevis* sl.) u kojima se transfekcijom inducira ekspresija specifičnog proteina ili miševa/stanica s inaktiviranim specifičnim genom

(Baker, 2015.; Bordeaux i sur., 2010.; Breljak i sur., 2013.; Holmseth i sur., 2012.; Kaufhold i sur., 2011.; Knauf i sur., 2001.; Krebs i sur., 2014.; Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.; Reynolds i sur., 2015.; Saper, 2009.; Waldegger i sur., 2001.). U bubrezima miševa, imunofluorescencijskom analizom protein mCfex je također lokaliziran u BBM proksimalnih kanalića bubrega. Međutim, detaljna stanična lokalizacija proteina mCfex duž mišjeg nefrona, s mogućim segmentalnim i zonalnim razlikama nije istraživana (Knauf i sur., 2001.). Stoga je trenutno nemoguće detaljnije usporediti profil ekspresije proteina Cfex duž nefrona između te dvije vrste glodavaca. Dosadašnja istraživanja funkcije proteina Cfex u bubregu miševa *Cfex* KO upućuju da ovaj protein, iako sposoban za izmjenu Cl^-/HCO_3^- i Cl^-/Ox^{2-}, ponajprije doprinosi transepitelnoj apsorpciji NaCl što je posljedica prijenosa iona Cl^- (u stanicu) zamjenu za izbacivanje iona Ox^{2-} u proksimalne kanaliće bubrega (Alper i Sharma, 2013.; Aronson, 2006.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.; Markovich i Aronson, 2007.). Kako slična istraživanja funkcije proteina rCfex u štakora trenutno nedostaju, pretpostavljamo da i u bubrezima štakora ovaj protein vjerojatno ostvaruje izmjenu Cl^-/HCO_3^- i Cl^-/Ox^{2-}, pri čemu je vezanje i izmjena oksalata njegova dominantna uloga. S druge strane, kod čovjeka, dosadašnja imunocitokemijska istraživanja pokazuju da je protein CFEX lokaliziran u stanicama različitih dijelova nefrona kao što su epitelne stanice distalnih dijelova proksimalnih kanalića, tankog i debelog uzlaznog kraka Henleove petlje, guste pjege, distalnih zavijenih kanalića i subpopulacije interkalirajućih stanica sabirnih kanala (Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.). Bitno je spomenuti kako je specifičnost protutijela za protein CFEX, korištenih u prethodnim radovima, provjerena blokadom protutijela imunizacijskim serumom (Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.) ili stanicama COS-1 transfeciranim sa cDNA za *CFEX* (Kujala i sur., 2005.). No, postojanje ovakvog složenijeg profila ekspresije proteina CFEX u čovjeka, u odnosu na ekspresiju proteina Cfex u štakora i miša, ukazuje na oprez pri pokušaju translacije podataka/saznanja o mogućim pato/fiziološkim ulogama proteina CFEX/Cfex između vrsta, točnije čovjeka i glodavaca (štakora i miševa) kao učestalo rabljenih pokusnih životinja. U ukupnim staničnim membrana izdvojenim iz bubrega (ali i ostalih ispitanih tkiva/organa), specifično protutijelo CFEX-Ab je tijekom western analize obilježilo jednu proteinsku vrpcu od ~120 kDa koja je u potpunosti blokirana upotrebom protutijela CFEX-Ab inkubiranim specifičnim imunizirajućim peptidom. Nasuprot ovom nalazu, u uzorcima ukupnih staničnih membrana izdvojenim iz maternice štakora, detektirana je proteinska vrpca za rCfex od ~90 kDa (Gholami i sur., 2012.). S obzirom na broj aminokiselinskih ostataka u proteinu rCfex (758) i pretpostavljeni broj *N*-glikozilacijskih mjesta (2), njegova relativna molekulska masa iznosila bi oko ~90 kDa. No, iako bi

molekulska masa od ~90 kDa odgovarala proteinu CFEX/Cfex u čovjeka i glodavaca s obzirom na broj aminokiselinskih ostataka i broj *N*-glikozilacijskih mjesta (Li i sur., 2014.), objašnjenje za pronalazak veće molekulske mase u ovom istraživanju možda mogu dati opažanja molekulskih masa proteina CFEX u rasponu od 84-200 kDa u različitim ekspresijskim staničnim sustavima (stanice MDCK i HEK293 te oocite žabe *X. laevis*) koja sugeriraju da je ovaj protein moguće podložan različitim stupnjevima glikozilacije (Li i sur., 2014.; Waldegger i sur., 2001.). Shodno tome, unatoč tome što su dosadašnja istraživanja u mnogim tkivima različitih sojeva miševa i štakora zabilježila molekulsku masu proteina Cfex od ~90 kDa (Alvarez i sur., 2004.; Gholami i sur., 2012.; Knauf i sur., 2001.; Petrović i sur., 2003b.; Wang i sur., 2002., 2005.), ne smijemo odbaciti mogućnost postojanja različitih tkivno- i vrsno-specifičnih modifikacija proteina rCfex koje bi mogle doprinijeti razlici utvrđenih molekulskih masa. Sukladno rezultatima imunofluorescencijske analize, western analiza je u bubrezima štakora potvrdila postojanje zonalnih razlika u ekspresiji proteina rCfex; ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) u uzorcima ukupnih staničnih membrana izdvojenih iz vanjskog tračka (odsječci S3) bubrega je ~7,3 puta jača u odnosu na membrane izdvojene iz kore (odsječci S1 i S2). Slična istraživanja, u kojima bi se pratile segmentalne i zonalne razlike u ekspresiji proteina mCfex/CFEX duž mišjeg i ljudskog nefrona, nisu do sada provedena (Alper i Sharma, 2013.; Knauf i sur., 2001.; Kujala i sur., 2005.; Lohi i sur., 2000.).

U ovom doktorskom radu je po prvi puta opisana tkivna distribucija i stanična lokalizacija proteina rCfex duž probavne cijevi štakora. U tankom crijevu štakora, protein rCfex imunolokaliziran je u četkastim (apikalnim) membranama enterocita smještenim u dvanaesniku i taštom crijevu, dok imunofluorescencijsko bojenje za rCfex nije detektirano u enterocitima vitog crijeva. Sukladno rezultatima RT-PCR analize, imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex nije detektirano u želucu, slijepom i debelom crijevu štakora. Intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za rCfex u četkastim membranama je ~1,9 puta jači u enterocitima smještenim u dvanaesniku u odnosu na one smještene u taštom crijevu, sugerirajući zonske razlike (dvanaesnik > tašto crijevo) u ekspresiji proteina rCfex uzduž tankog crijeva štakora. Sukladno rezultatima imunofluorescencijske analize, u ukupnim staničnim membrana izdvojenim iz tankog crijeva, specifično protutijelo CFEX-Ab je tijekom western analize obilježilo jednu proteinsku vrpcu od ~120 kDa pri čemu su uočene zonske razlike (dvanaesnik > tašto crijevo) u ekspresiji proteina od ~120 kDa duž tankog crijeva štakora. Do danas nisu objavljeni rezultati koji opisuju tkivnu distribuciju i staničnu

lokalizaciju proteina rCfex duž probavne cijevi u štakora. U miševa, dosadašnja imunocitokemijska istraživanja opisuju staničnu lokalizaciju proteina mCfex u apikalnim membranama enterocita dvanaesnika, ali bilježe i potpunu odsutnost imunofluorescencijskog obojenja za mCfex u debelom crijevu (Petrović i sur., 2002.; Wang i sur., 2002., 2005.), sukladno rezultatima tkivne distribucije proteina rCfex opisanim u ovom doktorskom radu. Osim toga, intenzitet imunofluorescencijskog bojenja za protein rCfex u dvanaesniku je ~4,9 puta jači u apikalnim membranama enterocita smještenim pri vrhovima crijevnih resica u odnosu na one smještene pri dnu crijevnih resica, što odgovara opisu distribucije proteina mCfex uzduž crijevnih resica u dvanaesniku miša (Petrović i sur., 2002.). Dodatno, za razliku od štakora, u miša je opisana stanična lokalizacija proteina mCfex u apikalnoj membrani parijetalnih stanica želuca (Petrović i sur., 2002.), ukazujući na postojanje vrstnih (lat. *species*) razlika u ekspresiji proteina Cfex duž probavne cijevi. Za razliku od glodavaca, stanična lokalizacija proteina CFEX u probavnoj cijevi čovjeka još uvijek nije poznata. Dosadašnja istraživanja u miševa kojima je inaktiviran gen *Cfex* (*Cfex* KO), ukazala su da protein Cfex ima važnu ulogu u izlučivanju HCO_3^- (prijenos Cl^-/HCO_3^-) u proksimalnom dijelu tankog crijeva (dvanaesnika) (Wang i sur., 2002., 2005.) što uz istovremenu aktivnost NHE3 (izmjenjivača Na^+/H^+ 3) doprinosi elektroneutralnoj apsorpciji Na^+ i Cl^-, ali i neutralizaciji kiselog sadržaja koji dolazi iz želuca (Alper i Sharma, 2013.; Aronson, 2006.; Wang i sur., 2002., 2005.). Dodatna istraživanja na modelu miševa *Cfex* KO ukazala su da je protein mCfex istovremeno bitan u izlučivanju oksalatnog iona Ox^{2-} u lumen tankog crijeva (dvanaesnika i vitog crijeva) (Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.) čime se posljedično sprječava unos velike količine navedenog iona u krv te se smanjuje vjerojatnost njegove koncentracije i nastanak kristala kalcijeva oksalata (bubrežnih kamenaca) u bubrezima (Aronson, 2006.; Freel i sur., 2006.; Jiang i sur., 2006.; Wang i sur., 2005.). Nadalje, uzmemo li u obzir rezultate prijašnjih istraživanja koji pokazuju postojanje transporta/izlučivanja bikarbonata (u dvanaesniku) i oksalata (u taštom i vitom crijevu) u tankom crijevu štakora i zeca (Brown i sur., 1989.; Freel i sur., 1994., 1998.; Isenberg i sur., 1993.; Knickelbein i sur., 1986.; Säfsten, 1993.), razumno je za pretpostaviti da bi fiziološka uloga proteina rCfex detektiranog u tankom crijevu (dvanaesniku i taštom crijevu) štakora mogla biti slična onoj opisanoj za protein mCfex u tankom crijevu miševa. Naime, na temelju objavljenih podataka za pretpostaviti je da se fiziološka uloga proteina rCfex u štakora i miševa očituje u obavljanju prijenosa aniona Cl^-/HCO_3^- i Cl^-/Ox^2, pri čemu je moguće da se prvi oblik prijenosa (Cl^-/HCO_3^-) možda dominantno ostvaruje u proksimalnim dijelovima tankog crijeva (dvanaesniku) dok se drugi oblik prijenosa (Cl^-/Ox^{2-}) dominantno ostvaruje u distalnim

dijelovima tankog crijeva (taštom i vitom crijevu). Suprotno tome, rezultati ranijih istraživanja u čovjeka ukazali su da se u fiziološkim uvjetima apsorpcija oksalatnog iona dominantno odvija u želucu i proksimalnim dijelovima tankog crijeva (Chen i sur., 2003.; Prenen i sur., 1984.) ukazujući na moguće razlike u prijenosu oksalatnog aniona između glodavaca i čovjeka. No, za kvalitetnu usporedbu fiziološkog značaja proteina CFEX/Cfex u različitih vrsta (glodavaca i čovjeka), nužna su daljnja istraživanja koja bi detaljno opisala ekspresiju proteina CFEX/Cfex i drugih proteina, npr. SLC26A2 koji moguće također obavlja prijenos oksalatnog iona u probavnoj cijevi glodavaca i čovjeka (Brzica i sur., 2013.).

U ovom doktorskom radu po prvi puta je opisana stanična lokalizacija proteina rCfex u jetri štakora u kojoj je protein rCfex imunolokaliziran u kanalikularnim membranama hepatocita. Stanična lokalizacija proteina rCfex u kanalikularnim membranama dodatno je potvrđena imunofluorescencijskim bojenjem za Na/K-ATPazu, kao biljegom za sinusoidalnu membranu hepatocita (Blitzer i sur., 1978.). Slično rezultatima western analize u bubrezima i tankom crijevu štakora, u jetri štakora uočena je proteinska vrpca za rCfex veličine ~120 kDa. Slični podaci o staničnoj lokalizaciji i ekspresiji proteina CFEX/Cfex u hepatocitima čovjeka i miševa trenutno ne postoje. No, poznato je da se u kanalikularnim membranama hepatocita, uz izlučivanje žučnih soli, odvija aktivno izlučivanje drugih organskih i anorganskih tvari koje prvenstveno uključuju glutation i bikarbonat (Banales i sur., 2006.). Dok se izlučivanje glutationa odvija putem prijenosnika organskih aniona MRP2/ABCC2, pokazano je da se izlučivanje bikarbonata odvija djelovanjem DIDS (engl. *4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid*)-inhibirajućeg, o natriju neovisnog elektroneutralnog izmjenjivača aniona Cl^-/HCO_3^- SLC4A2, koji je funkcionalno karakteriziran u sustavu kanalikularnih membranskih vezikula izdvojenih iz jetre štakora te imunolokaliziran u kanalikularnoj membrani hepatocita u čovjeka (Banales i sur., 2006.; Boyer, 2013.; Meier i sur., 1985.). Shodno tome, uzimajući u obzir činjenicu kako postoji nedostatak podataka o funkcionalnoj karakterizaciji proteina rCfex, a karakteristike izmjene aniona Cl^-/HCO_3^- proteinom CFEX/Cfex se razlikuju između različitih vrsta; u miševa (elektrogena) i čovjeka (elektroneutralna) (Alper i Sharma, 2013.), teško je reći je li izmjena navedenih aniona primarna fiziološka uloga proteina rCfex u jetri štakora. No, s druge strane poznato je da se u fiziološkim uvjetima oksalatni anion u velikom dijelu proizvodi kao nusprodukt metabolizma hepatocita, potom se prenosi u krv putem prijenosnika Sat-1 na sinusoidalnoj membrani hepatocita, te se konačno izbacuje iz organizma procesima glomerularne filtracije i izlučivanja putem proksimalnih kanalića bubrega (Brzica i sur., 2009a., 2013.). Dodatno,

autori istih istraživanja pretpostavljaju da bi se dio oksalatnih iona (u zamjenu za još neodređene anione) iz hepatocita mogao usporedno izlučivati u žuč posredstvom proteina CFEX/Cfex (Brzica i sur., 2013.). No, kako bi odredili moguću primarnu fiziološku ulogu proteina CFEX/Cfex u jetri štakora i ostalih sisavaca potrebna su dodatna istraživanja koja bi opisala funkcionalnu aktivnost ovih proteina u kanalikularnim membranama hepatocita glodavaca i čovjeka.

Nadalje, u ovom doktorskom radu opisana je stanična lokalizacija proteina rCfex u gušterači štakora u kojoj je protein rCfex imunolokaliziran u luminalnim membranama izvodnih kanalića gušterače. Rezultati western analize, kao i u svim ostalim ispitanim organima/tkivima štakora, utvrdili su proteinsku vrpcu za rCfex od ~120 kDa. Za usporedbu, podaci o staničnoj lokalizaciji i ekspresiji proteina mCfex u gušterači miševa još uvijek nedostaju, dok je u gušterači čovjeka i štakora protein CFEX prethodno imunolokaliziran u luminalnim membranama epitelnih stanica izvodnih kanalića (Ko i sur., 2004.; Lohi i sur., 2000.), što se podudara s nalazom stanične lokalizacije proteina rCfex u gušterači štakora u ovom doktorskom radu. Poznato je da sekretinom stimulirane epitelne stanice izvodnih kanalića gušterače mogu u čovjeka i zamorca izlučivati tekućinu bogatu bikarbonatom (~140 mM) (Alper i Sharma, 2013.; Lee i sur., 2012.; Steward i Ishiguro, 2009.; Stewart i sur., 2011.) kao i u miševa i štakora (~40-70 mM) (Alper i Sharma, 2013.; Steward i Ishiguro, 2009.; Stewart i sur., 2011.). No, iako je primijećeno da je zamorac moguće pogodniji model za istraživanje uloge proteina CFEX u gušterači čovjeka, istraživanja provedena u zamorca i miševa *Cfex* KO ukazala su na jedinstvenu činjenicu da je u izvodnim kanalićima gušterače sisavaca protein Cfex, uz interakciju s proteinom CFTR poglavito zadužen za izlučivanje bikarbonata i stvaranje bikarbonatom bogate tekućine (Alper i Sharma, 2013.; Ko i sur., 2002., 2004.; Lee i sur., 2012.; Steward i Ishiguro, 2009.; Stewart i sur., 2011.; Wang i sur., 2006.). Takva, bikarbonatom bogata tekućina ima bitnu ulogu u sprječavanju prerane aktivacije proenzima izlučenih iz acinarnih stanica gušterače te neutralizacije želučane kiseline u dvanaesniku (Alper i Sharma, 2013.; Hegyi i sur., 2011.). Shodno tome, u nedostatku sličnih podataka za štakore, moguće je pretpostaviti da bi primarna fiziološka uloga proteina rCfex u izvodnim kanalićima gušterače štakora također mogla biti prijenos bikarbonatnih iona u lumen istih s ciljem sprječavanja aktivacije izlučenih enzima gušterače i puferiranja sadržaja tankog crijeva (dvanaesnika) u kojem dolazi do njegove razgradnje.

U ovom doktorskom radu po prvi puta je opisana spolno ovisna ekspresija mRNA i proteina rCfex u bubrezima štakora. U jetri i gušterači spolno zrelih štakora, ekspresija mRNA i

proteina rCfex nije ovisna o spolu, tj. podjednaka je u mužjaka i ženki. Rezultati qRT-PCR-a, western i imunofluorescencijske analize ovog doktorskog rada pokazuju da je ekspresija mRNA i proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora jača u mužjaka u odnosu na ženke (mužjaci > ženke), što sugerira da je ista regulirana i na razini transkripcije (mRNA) i na razini translacije (protein). Nadalje, rezultati imunokemijskih analiza pokazali su da kastracija smanjuje, a ovarijektomija ne mijenja ekspresiju proteina rCfex u bubrezima štakora, ukazujući na stimulacijski učinak androgenih hormona. Dodatne imunokemijske analize potvrdile su stimulacijski učinak testosterona; testosteron stimulira, a estradiol i progesteron ne mijenjaju ekspresiju proteina rCfex u bubrezima kastriranih mužjaka. Za razliku od spolno zrelih štakora, u bubrezima spolno nezrelih životinja ekspresija proteina rCfex podjednaka je u oba spola; slična je onoj nađenoj u spolno zrelih ženki, a niža od one pronađene u spolno zrelih mužjaka. Drugim riječima, spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u bubrezima štakora javljaju se nakon puberteta uslijed stimulacijskog učinka testosterona.

U jetri i bubrezima čovjeka i glodavaca (miševi i štakori), ekspresija mRNA i proteina mnogobrojnih membranskih prijenosnika unutar nadobitelji SLC (prijenosnici za organske anione, katione i glukozu) i nadobitelji ABC (prijenosnici Mrp) regulirana je spolnim hormonima (Sabolić i sur., 2007., 2011.). *In silico* analiza promotorskih regija tih prijenosnika ukazuje na postojanje specifičnih sljedova nukleotida osjetljivih na androgene (ARE), estrogen (ERE) i progesteron (PRE) (engl. *Progesteron Resposne Elements*) koji posljedično reguliraju transkripciju ciljnih gena (Sabolić i sur., 2007.). No, do sada nije istraženo postoje li u promotorskim regijama gena unutar obitelji Slc26 sljedovi ARE, ERE i PRE koji bi mogli regulirali transkripciju specifičnih membranskih prijenosnika, uključujući i rCfex. Također, o spolu ovisna ekspresija mRNA i proteina CFEX/Cfex u čovjeka i glodavaca (štakora i miševa) još uvijek nije istražena (Alper i Sharma, 2013.; Brzica i sur., 2009a., 2013.). Jedini član obitelji Slc26, za kojeg postoje podaci o spolno ovisnoj ekspresiji, je membranski prijenosnik za sulfatni anion 1 (Sat-1, Slc26a1) (Brzica i sur., 2009a., 2013.). Rezultati western i imunocitokemijske analize pokazali su da je ekspresija proteina Sat-1 u jetri i bubrezima štakora značajno veća u mužjaka nego u ženki. Međutim, metodom qRT-PCR-a nisu uočene spolne razlike u ekspresiji mRNA za *Sat-1*, kako u jetri, tako ni u bubrezima štakora. Na modelu gonadektomiranih životinja, te kastriranih mužjaka tretiranih estradiolom i progesteronom, utvrđeno je da su spolne razlike u ekspresiji proteina Sat-1 posljedica inhibitornog učinka estradiola i progesterona na post-transkripcijskoj razini (Brzica i sur., 2009a., 2013.). Dakle, za razliku od proteina Sat-1 (Slc26a1), navedeni rezultati ovog

doktorskog rada upućuju na stimulacijski učinak testosterona na ekspresiju proteina rCfex (Slc26a6) u bubrezima štakora.

Iz ovih saznanja izgledno je za pretpostaviti kako testosteron, osim što utječe na povećanu proizvodnju oksalata u hepatocitima i doprinosi povećanju oksidativnog stresa u bubrežnim kanalićima (Fan i sur., 1999.; Lee i sur., 1992.; Liang i sur., 2014.; Yoshioka i sur., 2010.), također stimulira i ekspresiju rCfex-a u proksimalnim kanalićima bubrega. Tako, uz spolno-ovisnu ekspresiju proteina Sat-1 (mužjaci > ženke), moguće pridonosi povećanom prijenosu stvorenog oksalatnog iona iz krvi u lumen bubrežnih kanalića. Naime, u pato/fiziološkom stanju bolesti bubrežnih kamenaca moguće je pretpostaviti da bi povećani unos oksalata i njegovih prekursora putem hrane i povećano stvaranje oksalata u stanicama jetre, potaknuto učinkom testosterona (mužjaci/muškarci > ženke/žene), mogli uzrokovati porast razine oksalata u krvi. Posljedično bi se taj oksalat prenosio iz krvi, putem prijenosnika Sat-1, u lumen proksimalnih kanalića bubrega, putem prijenosnika CFEX/Cfex. U tom slučaju bi u pripadnika muškog spola, uključujući glodavce i ljude, moglo doći do zasićenja otopine ultrafiltrata oksalatnim ionom i povećane mogućnosti za stvaranje kristala kalcijeva oksalata u bubrezima. Navedeno otkriće spolno ovisne ekspresije proteina rCfex u bubrezima štakora u ovom doktorskom radu vrlo je zanimljivo obzirom na činjenicu da su hiperoksalurija i bubrežni kamenci 2-3 puta učestaliji u ljudi i glodavaca muškog spola u odnosu na ženski spol (Breljak i sur., 2015.; Brzica i sur., 2013.; Coe i sur., 2005.; Costa-Bauzá i sur., 2007.; Dall'era i sur., 2005.; Hesse i sur., 1987.; Iguchi i sur., 1999.; Jiang i sur., 2006.; Khan i Glenton, 2010.; Kohri i sur., 1991.; Lee i sur., 1996.; Lemann i sur., 1996.; Liebman i Costa, 2000.; Sakhaee, 2009.). Kako je oksalatni ion prepoznat kao dominantni supstrat za protein Cfex u crijevima i bubrezima miševa *Cfex* KO (Aronson, 2006.; Chernova i sur., 2005.; Jiang i sur., 2002.; Xie i sur., 2002.), otkriće spolnih razlika u ekspresiji proteina rCfex u bubrezima moglo bi djelomično doprinijeti objašnjenju spolnih razlika u incidenciji stvaranja kristala kalcijeva oksalata, tj. bubrežnih kamenaca u ljudi i laboratorijskih životinja (miševa i štakora). U bubrezima i jetri štakora pronađena je slična spolno ovisna ekspresija proteina Sat-1 (mužjaci > ženke), pa je već ranije pretpostavljeno da bi transport oksalata mogao biti posredovan združenom aktivnošću oba proteina (Sat-1 i Cfex) (Brzica i sur., 2009a.). Također, kako je protein Sat-1, za razliku od proteina CFEX/Cfex, lokaliziran na BLM proksimalnih kanalića, pretpostavljeno je da bi združenim djelovanjem proteina Sat-1 i Cfex bio omogućen prijenos oksalata iz krvi u epitelne stanice proksimalnih kanalića kroz BLM proksimalnih kanalića (posredstvom Sat-1) i njegovo izlučivanje kroz BBM proksimalnih

kanalića (posredstvom Cfex-a) u lumen proksimalnih kanalića (Brzica i sur., 2009a., 2013.; Marengo i Romani, 2008.; Schnedler i sur., 2011.). Međutim, protein Sat-1 je većim dijelom lokaliziran u BLM proksimalnih kanalića (odsječci S1 i S2) smještenih u kori bubrega (Brzica i sur., 2009a.; Karniski i sur., 1998.) u odnosu na protein rCfex (rezultati ovog doktorskog rada) koji je većim dijelom lokaliziran u BBM proksimalnih kanalića (odsječci S3) smještenih u vanjskom tračku. Stoga, prijenos oksalata vjerojatno nije posredovan isključivo pretpostavljenim združenim djelovanjem proteina Sat-1 i rCfex smještenim na BLM (Sat-1) i BBM (rCfex) proksimalnih kanalića. Drugim riječima, nije teško zamisliti da uz spomenuta dva prijenosnika oksalatnog iona (Sat-1 i rCfex) na membranama proksimalnih kanalića postoje i drugi, još neopisani prijenosnici, koji doprinose prijenosu oksalata iz krvi u bubrežne kanaliće i prijenosu oksalata iz bubrežnih lanalića u njihov lumen.

Nadalje, prijašnja istraživanja provedena na ljudima i kastriranim štakorima ukazala su da bi povećane razine testosterona i dihidrotestosterona mogle imati značajnu ulogu u stvaranju bubrežnih kamenaca i objasniti različitu incidenciju stvaranja kristala kalcijeva oksalata među spolovima (Fan i sur., 1999.; Lee i sur., 1992., 1996.; Li i sur., 2010.; Liang i sur., 2014.; Watson i sur., 2010.; Yagisawa i sur., 2001.; Yoshioka i sur., 2010.). Dosada se učinak testosterona uglavnom promatrao u okviru čimbenika koji bi mogli utjecati na povećanu sintezu oksalata (npr. ekspresija enzima glikolat oksidaze) i oksidativni stres (npr. ekspresija NADPH oksidaze) te time doprinijeti stvaranju oksalatnih kamenaca u bubrežnim kanalićima (Fan i sur., 1999.; Lee i sur., 1992.; Yoshioka i sur., 2010.). Rezultati nedavnog istraživanja u miševa s inaktiviranim genom za receptor androgena (engl. *Androgen Receptor Knock Out mice*; ARKO) i ljudi oboljelih od bubrežnih kamenaca ukazali su na važnost testosterona u povećanju ekspresije enzima glikolat oksidaze u jetri i podjedinice p22-PHOX oksidaze NADPH u bubrezima miševa i ljudi. Naime, pokazano je da povećana ekspresija enzima glikolat oksidaze uslijed stimulacijskog učinka testosterona dovodi do povećane proizvodnje oksalatnog iona u hepatocitima. Osim toga, uočeno je da testosteron povećava aktivnost podjedinice p22-PHOX oksidaze NADPH u bubrezima i posljedično mijenja anabolizam reaktivnih oksidativnih vrsta te dovodi do oštećenja bubrežnih kanalića, što je, prema ranijim istraživanjima (Davalos i sur., 2010.; Hirose i sur., 2010.; Zuo i sur., 2011.) jedan od preduvjeta stvaranja kristala kalcijeva oksalata u bubrezima (Liang i sur., 2014.). Ipak, učinak spolnih hormona (poglavito testosterona) na ekspresiju proteina CFEX/Cfex, koji je uz protein SAT-1/Sat-1 moguće zadužen za obavljanje značajnog prijenosa oksalata iz krvi u

lumen bubrežnih kanalića sisavaca (Brzica i sur., 2009a., 2013.; Marengo i Romani, 2008.; Schnedler i sur., 2011.), još nije istražen. S obzirom na navedene učinke testosterona i činjenicu da su spolne razlike u incidenciji nefrolitijaze/urolitijaze uočene isključivo u ljudi srednje životne dobi (Brzica i sur., 2013.; Dall'era i sur., 2005.; Kohri i sur., 1991.; Lemann i sur., 1996.; Liebman i Costa, 2000.), može se pretpostaviti da tek razvojem spolnih žlijezda nastaju preduvjeti koji doprinose stvaranju navedenih spolnih razlika u odrasloj populaciji. Drugim riječima, kako bi ukazali na važnost testosterona u regulaciji incidencije nefrolitijaze/urolitijaze, potrebno je dodatno proučiti regulaciju ekspresije proteina CFEX/Cfex u bubrezima djece i spolno nezrelih glodavaca.

Rezultati prikazani u ovom doktorskom radu po prvi puta detaljno opisuju staničnu lokalizaciju proteina rCfex, te njegovu ekspresiju na razini mRNA i proteina u različitim organima/tkivima štakora soja Wistar. Također, rezultati ovog doktorskog po prvi puta opisuju spolne razlike (mužjaci > ženke) u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u bubrezima štakora, koje se javljaju nakon puberteta uslijed stimulacijskog učinka testosterona. Dobiveni rezultati omogućit će bolje razumijevanje fiziološke uloge prijenosnika CFEX/Cfex u nastanku urolitijaze/nefrolitijaze, ali moguće i nekih drugih pato/fizioloških stanja u ljudi i glodavaca (štakora i miševa), kao učestalo rabljenih pokusnih životinja u pato/fiziološkim, farmakološkim i toksikološkim istraživanjima.

6. ZAKLJUČCI

1. Metodom klasičnog RT-PCR-a utvrđena je ekspresija mRNA za *rCfex* u različitim tkivima/organima štakora uključujući bubrege, jetru, gušteraču i tanko crijevo (dvanaesnik, tašto crijevo i vito crijevo). Ekspresija mRNA za *rCfex* nije utvrđena u želucu, slijepom i debelom crijevu štakora.

2. Metodama molekularnog kloniranja konstruiran je rekombinantni plazmid pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex* kojime su prolazno transfecirane stanice HEK293.

3. Efikasnost transfekcije stanica HEK293 potvrđena je imunofluorescencijskom analizom usporedbom kontrolnih stanica HEK293 koje su prolazno transfecirane plazmidom koji ne sadrži cDNA za *rCfex* i stanica HEK293 koje su prolazno transfecirane rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC s ukloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*. Protutijela za polihistidinski biljeg (6xHis-Ab) i protein rCfex (CFEX-Ab) obojila su stanične membrane HEK293 stanica transfeciranih sa cDNA za *rCfex*.

4. Specifičnost protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) potvrđena je imunofluorescencijskom analizom; protutijelo CFEX-Ab obojilo je staničnu membranu stanica HEK293 koje su prolazno transfecirane rekombinantnim plazmidom pcDNA^{TM}3.1/HisC s kloniranom cjelovitom cDNA za *rCfex*, dok je stanična membrana kontrolnih stanica koje su prolazno transfecirane plazmidom koji ne sadrži cDNA za *rCfex*, ostala neobojana.

5. Stanična lokalizacija i ekspresija proteina rCfex utvrđena je metodama imunofluorescencijske i western analize upotrebom specifičnog protutijela za protein rCfex (CFEX-Ab) u različitim tkivima i organima štakora:

a. U bubrezima, protein rCfex lokaliziran je u četkastim membranama proksimalnih kanalića smještenih u kori (odsječci S1 i S2), medularnim zrakama (odsječci S3) i vanjskom tračku (odsječci S3). U ostalim zonama nefrona, uključujući unutarnji tračak i papilu, protein rCfex nije pronađen. U ukupnim

staničnim membranama izdvojenim iz bubrega, protutijelo CFEX-Ab obilježilo je jednu proteinsku prugu (~120 kDa) koja je blokirana imunizacijskim peptidom. Ekspresija proteina rCfex duž nefrona pokazuje zonalne (kora < vanjski tračak) i segmentalne ((S1 ~ S2) < S3) razlike. Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex je ~6,8 (u mužjaka) i ~2 (u ženki) jače u četkastim membranama odsječaka S3 proksimalnih kanalića u vanjskom tračku u odnosu na odsječke S1 i S2 proksimalnih kanalića u kori. Također, ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) je ~7,3 puta jača u vanjskom tračku u odnosu na koru.

b. U crijevima, protein rCfex lokaliziran je u četkastim membranama enterocita smještenih u dvanaesniku i taštom crijevu. U distalnom dijelu tankog crijeva (vito crijevo), slijepom i debelom crijevu, protein rCfex nije pronađen. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz dvanaesnika i taštog crijeva, protutijelo CFEX-Ab obilježilo je jednu proteinsku prugu (~120 kDa) koja je blokirana imunizacijskim peptidom. Ekspresija proteina rCfex duž tankog crijeva pokazuje zonske razlike (dvanaesnik > tašto crijevo), dok u vitom crijevu protein rCfex nije pronađen. Imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex je ~1,9 puta jače u četkastim membranama enterocita smještenih u dvanaesniku u odnosu na one smještene u taštom crijevu, a ekspresija proteina rCfex (~120 kDa) je ~2,6 puta jača u dvanaesniku u odnosu na tašto crijevo. Također, ekspresija proteina rCfex je različita uzduž samih crijevnih resica; imunofluorescencijsko bojenje za protein rCfex je ~4,6 puta jače u četkastim membranama enterocita pri vrhu crijevnih resica u odnosu na četkaste membrane smještene pri dnu crijevnih resica.

c. U jetri, protein rCfex lokaliziran je u kanalikularnim membranama hepatocita. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz jetre, protutijelo CFEX-Ab obilježilo je jednu proteinsku prugu (~120 kDa) koja je blokirana imunizacijskim peptidom.

d. U gušterači, protein rCfex lokliziran je u luminalnim membranama izvodnih kanalića. U ukupnim staničnim membranama izdvojenim iz gušterače, protutijelo CFEX-Ab obilježilo je jednu proteinsku prugu (~120 kDa) koja je blokirana imunizacijskim peptidom.

6. Ekspresija mRNA i proteina rCfex ovisna je o spolu u bubrezima spolno zrelih štakora, tj. jača je u mužjaka nego u ženki (mužjaci > ženke); ekspresija mRNA za *rCfex* je ~1,2 puta jača u bubrezima mužjaka u odnosu na ženke, a ekspresija proteina rCfex je ~1,5 puta jača u bubrezima mužjaka nego u ženki.

7. Spolne razlike u ekspresiji proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora (mužjaci > ženke) javljaju se nakon puberteta uslijed stimulacijskog učinka testosterona:

a. Kastracijom mužjaka smanjuje se ekspresija proteina rCfex u bubrezima, a ovarijektomijom ženki njegova ekspresija se ne mijenja.
b. Testosteron povećava ekspresiju proteina rCfex u bubrezima kastriranih mužjaka, a estradiol i progesteron ne mijenjaju njegovu ekspresiju.
c. Ekspresija proteina rCfex nije ovisna o spolu u bubrezima spolno nezrelih štakora; manja je od one izmjerene u odraslih mužjaka, ali slična onoj izmjerenoj u odrasle ženke.

8. Ekspresija mRNA i proteina rCfex nije ovisna o spolu u jetri i gušterači spolno zrelih štakora, tj. podjednaka je u mužjaka i ženki (mužjaci ≈ ženke).

9. Rezultati ovog doktorskog rada, u kojem je utvrđena: 1) stanična lokalizacija i ekspresija proteina rCfex u različitim tkivima i organima štakora, 2) spolne razlike u ekspresiji mRNA i proteina rCfex u bubrezima spolno zrelih štakora i 3) stimulacijski učinak testosterona na regulaciju ekspresije proteina rCfex u bubrezima štakora, pridonijet će boljem razumijevanju pato/fiziološke uloge proteina rCfex u nastanku spolnih razlika u incidenciji nefrolitijaze/urolitijaze i drugih patofizioloških procesa u pokusnih životinja i ljudi.

7. LITERATURA

Abd-Elsalam KA (2003) Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. African J Biotechnol 2: 91–95.

Alnouti Y, Petrick JS, Klaassen CD (2006) Tissue distribution and ontogeny of organic cation transporters in mice. Drug Metab Dispos 34: 477–482.

Alper SL, Sharma AK (2013) The SLC26 gene family of anion transporters and channels. Mol Aspects Med 34: 494–515.

Alvarez B V, Kieller DM, Quon AL, Markovich D, Casey JR (2004) Slc26a6: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. J Physiol 561: 721–734.

Alvarez-Leefmans FJ, Delpire E (2009) Physiology and Pathology of chloride transporters and channels in the nervous system: From molecules to diseases. 1st edn. Academic Press, London 58–66.

Antón FM, García Puig J, Ramos T, González P, Ordás J (1986) Sex differences in uric acid metabolism in adults: evidence for a lack of influence of estradiol-17 beta (E2) on the renal handling of urate. Metabolism 35: 343–348.

Aravind L, Koonin E V (2000) The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. Curr Biol 10: R53–R55.

Aronson PS (2002) Ion exchangers mediating NaCl transport in the renal proximal tubule. Cell Biochem Biophys 36: 147–153.

Aronson PS (2006) Essential roles of CFEX-mediated Cl(-)-oxalate exchange in proximal tubule NaCl transport and prevention of urolithiasis. Kidney Int 70: 1207–1213.

Asaka J, Terada T, Okuda M, Katsura T, Inui K (2006) Androgen receptor is responsible for rat organic cation transporter 2 gene regulation but not for rOCT1 and rOCT3. Pharm Res 23: 697–704.

Audy MC, Vacher P, Duly B (1996) 17 beta-estradiol stimulates a rapid Ca2+ influx in LNCaP human prostate cancer cells. Eur J Endocrinol 135: 367–373.

Azenabor AA, Hoffman-Goetz L (2001) 17β-estradiol increases Ca2+ influx and down regulates interleukin-2 receptor in mouse thymocytes. Biochem Biophys Res Commun 281: 277–281.

Baker M (2015) Blame it on the antibodies. Nature 521: 274–275.

Balen D, Ljubojevic M, Breljak D, Brzica H, Zlender V, Koepsell H, i sur. (2008) Revised immunolocalization of the Na+-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. Am J Physiol Cell Physiol 295: C475–C489.

Banales JM, Prieto J, Medina JF (2006) Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. World J Gastroenterol 12: 3496–3511.

Baulieu EE, Robel P (1995) Non-genomic mechanisms of action of steroid hormones. Ciba Found Symp 191: 24–42.

Bayaa M, Vulesevic B, Esbaugh A, Braun M, Ekker ME, Grosell M, i sur. (2009) The involvement of SLC26 anion transporters in chloride uptake in zebrafish (Danio rerio) larvae. J Exp Biol 212: 3283–3295.

Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. Hum Reprod Update 6: 225–236.

Beermann S, Seifert R, Neumann D (2012) Commercially available antibodies against human and murine histamine H4-receptor lack specificity. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 385: 125–135.

Belostotsky R, Seboun E, Idelson GH, Milliner DS, Becker-Cohen R, Rinat C, i sur. (2010) Mutations in DHDPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. Am J Hum Genet 87: 392–399.

Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wunderlich F (1998) Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. FEBS Lett 422: 349–353.

Benten WPM, Stephan C, Lieberherr M, Wunderlich F (2001) Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. Endocrinology 142: 1669–1677.

Bissig M, Hagenbuch B, Stieger B, Koller T, Meier PJ (1994) Functional expression cloning of the canalicular sulfate transport system of rat hepatocytes. J Biol Chem 269: 3017–3021.

Björnström L, Sjöberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol 19: 833–842.

Blitzer BL, Boyer JL, Unit LS (1978) Cytochemical localization of Na+, K+-ATPase in the rat hepatocyte. J Clin Invest 62: 1104–1108.

Bonate PL (1991) Gender-related differences in xenobiotic metabolism. J Clin Pharmacol 31: 684–690.

Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, i sur. (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. Mol Cell 8: 269–280.

Bordeaux J, Welsh AW, Agarwal S, Killiam E, Baquero MT, Hanna JA, i sur. (2010) Antibody validation. Biotechniques 48: 197–209.

Borghi L, Ferretti PP, Elia GF, Amato F, Melloni E, Trapassi MR, i sur. (1990) Epidemiological study of urinary tract stones in a northern Italian city. Br J Urol 65: 231–235.

Boron W (2004) Regulation of intracellular pH. Adv Physiol Educ 28: 160–179.

Boussif O (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci 92: 7297–7301.

Boussif O, Zanta MA, Behr JP (1996) Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. Gene Ther 3: 1074–80.

Boyer JL (2013) Bile formation and secretion. Compr Physiol 3: 1035–1078.

Boyle D, Clifford AM, Orr E, Chamot D, Goss GG (2015) Mechanisms of Cl − uptake in rainbow trout : Cloning and expression of slc26a6, a prospective Cl-/HCO3- exchanger. Comp Biochem Physiol Part A 180: 43–50.

Bradbury A, Plückthun A (2015) Reproducibility: Standardize antibodies used in research. Nature 518: 27 –29.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 254: 248–254.

Brändle E, Bernt U, Hautmann RE (1998) In situ characterization of oxalate transport across the basolateral membrane of the proximal tubule. Pflügers Arch Eur J Physiol 435: 840–849.

Breljak D, Brzica H, Sweet DH, Anzai N, Sabolić I (2013) Sex-dependent expression of Oat3 (Slc22a8) and Oat1 (Slc22a6) proteins in murine kidneys. Am J Physiol Renal Physiol 304: F1114–F1126.

Breljak D, Brzica H, Vrhovac I, Micek V, Karaica D, Ljubojević M, i sur. (2015) In female rats, ethylene glycol treatment elevates protein expression of hepatic and renal oxalate transporter sat-1 (Slc26a1) without inducing hyperoxaluria. Croat Med J 56: 447–459.

Breljak D, Ljubojević M, Balen D, Žlender V, Brzica H, Micek V, i sur. (2010) Renal expression of organic anion transporter Oat5 in rats and mice exhibits the female-dominant sex differences. Histol Histopathol 25: 1385–1402.

Breljak D, Ljubojević M, Hagos Y, Micek V, Balen Eror D, Vrhovac Madunić I, i sur. (2016) Distribution of the organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron. Am J Physiol Renal Physiol ajprenal.00113.2016doi:10.1152/ajprenal.00113.2016.

Brown CD, Dunk CR, Turnberg LA (1989) Cl-HCO3 exchange and anion conductance in rat duodenal apical membrane vesicles. Am J Physiol 257: G661–G667.

Brzica H, Breljak D, Burckhardt BC, Burckhardt G, Sabolić I (2013) Oxalate: from the environment to kidney stones. Arh Hig Rada Toksikol 64: 609–630.

Brzica H, Breljak D, Krick W, Lovrić M, Burckhardt G, Burckhardt BC, i sur. (2009a) The liver and kidney expression of sulfate anion transporter sat-1 in rats exhibits male-dominant gender differences. Pflugers Arch 457: 1381–1392.

Brzica H, Breljak D, Ljubojević M, Balen D, Micek V, Anzai N, i sur. (2009b) Optimal methods of antigen retrieval for organic anion transporters in cryosections of the rat kidney. Arh Hig Rada Toksikol 60: 7–17.

Brzica H, Breljak D, Vrhovac I, Sabolić I (2011) Role of microwave heating in antigen retrieval in cryosections of formalin-fixed tissues. Microw heating Chandra U (ed) IN-TECH Open, Rijeka, Croat 41–62.

Buchholz NPN, Abbas F, Khan R, Talati J, Afzal M, Rizvi I (2003) The prevalence of silent kidney stones-an ultrasonographic screening study. J Pak Med Assoc 53: 24–25.

Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, Delucas LJ (2007) His-tag impact on structure. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 63: 295–301.

Casey JR, Grinstein S, Orlowski J (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 50–61.

Castoria G, Barone MV, Domenico M Di, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, i sur. (1999) Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. EMBO J 18: 2500–2510.

Cerrutti JA, Brandoni A, Quaglia NB, Torres AM (2002) Sex differences in p-aminohippuric acid transport in rat kidney: role of membrane fluidity and expression of OAT1. Mol Cell Biochem 233: 175–179.

Chant A, Kraemer-Pecore CM, Watkin R, Kneale GG (2005) Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the Aspergillus nidulans gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. Protein Expr Purif 39: 152–159.

Chávez JC, Hernández-González EO, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A, Treviño CL (2012) Participation of the Cl-/HCO(3)- exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl- channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. Biol Reprod 86: 1–14.

Chen C, Klaassen CD (2004) Rat multidrug resistance protein 4 (Mrp4, Abcc4): molecular cloning, organ distribution, postnatal renal expression, and chemical inducibility. Biochem Biophys Res Commun 317: 46–53.

Chen Z, Ye Z, Zeng L, Yang W (2003) Clinical investigation on gastric oxalate absorption. Chinese Med Jounral 116: 1749–1751.

Chernova MN, Jiang L, Friedman DJ, Darman RB, Lohi H, Kere J, i sur. (2005) Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. J Biol Chem 280: 8564–8580.

Choi BY, Stewart AK, Madeo AC, Pryor SP, Lenhard S, Kittles R, i sur. (2009) Hypo-functional SLC26A4 variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype-phenotype correlation or coincidental polymorphisms? Hum Mutat 30: 599–608.

Coe FL (1978) Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. Kidney Int 13: 418–426.

Coe FL, Evan A, Worcester E (2005) Kidney stone disease. J Clin Invest 115: 2598–2608.

Coe FL, Parks JH (1981) Hyperuricosuria and calcium nephrolithiasis. Urol Clin North Am 8: 227–244.

Corbetta S, Eller-Vainicher C, Frigerio M, Valaperta R, Costa E, Vicentini L, i sur. (2009) Analysis of the 206M polymorphic variant of the SLC26A6 gene encoding a Cl- oxalate transporter in patients with primary hyperparathyroidism. Eur J Endocrinol 160: 283–288.

Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Grases F, Conte A, Pizá P, i sur. (2007) Type of renal calculi: variation with age and sex. World J Urol 25: 415–21.

Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, Klaassen CD (2009) Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. Pharmacology 37: 203–210.

Dall'era JE, Kim F, Chandhoke PS (2005) Gender differences among hispanics and caucasians in symptomatic presentation of kidney and ureteral stones. J Endourol 19: 283–286.

Danpure C (2001) Primary hyperoxaluria. Metab Mol Basis Inherit Dis 3323–3367.

Danpure CJ, Jennings PR (1986) Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. FEBS Lett 201: 20–24.

Daudon M, Donsimoni R, Hennequin C, Fellahi S, Moel G Le, Paris M, i sur. (1995) Sex- and age-related composition of 10 617 calculi analyzed by infrared spectroscopy. Urol Res 23: 319–326.

Daudon M, Doré J-C, Jungers P, Lacour B (2004) Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach. Urol Res 32: 241–247.

Daudon M, Lacour B, Jungers P (2006) Influence of body size on urinary stone composition in men and women. Urol Res 34: 193–199.

Davalos M, Konno S, Eshghi M, Choudhury M (2010) Oxidative renal cell injury induced by calcium oxalate crystal and renoprotection with antioxidants: a possible role of oxidative stress in nephrolithiasis. J Endourol 24: 339–345.

Dawson PA, Rakoczy J, Simmons DG (2012) Placental, renal, and ileal sulfate transporter gene expression in mouse gestation. Biol Reprod 87: 1–9.

Dawson PA, Russell CS, Lee S, Mcleay SC, Dongen JM Van, Cowley DM, i sur. (2010) Urolithiasis and hepatotoxicity are linked to the anion transporter Sat1 in mice. J Clin Invest 120: 706–712.

Demitrack ES, Soleimani M, Montrose MH (2010) Damage to the gastric epithelium activates cellular bicarbonate secretion via SLC26A9 Cl(-)/HCO(3)(-). Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 299: G255–G264.

Dirami T, Rode B, Jollivet M, Silva N Da, Escalier D, Gaitch N, i sur. (2013) Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia. Am J Hum Genet 92: 760–766.

Dobbins JW, Binder HJ (1976) Effect of bile salts and fatty acids on the colonic absorption of oxalate. Gastroenterology 70: 1096–1100.

Dorwart MR, Shcheynikov N, Yang D, Muallem S (2007) The solute carrier 26 family of proteins in epithelial ion transport. Physiology (Bethesda) 23: 104–114.

Dwyer ME, Krambeck AE, Bergstralh EJ, Milliner DS, Lieske JC, Rule AD (2012) Temporal trends in incidence of kidney stones among children: a 25-year population based study. J Urol 188: 247–252.

Edvardsson V, Elidottir H, Indridason OS, Palsson R (2005) High incidence of kidney stones in Icelandic children. Pediatr Nephrol 20: 940–944.

Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Shao Y, Parks JH, Bledsoe SB, i sur. (2005) Crystal-associated nephropathy in patients with brushite nephrolithiasis. Kidney Int 67: 576–591.

Everett L, Glaser B, Beck JC, Idol J, Buchs A, Heyman M, i sur. (1997) Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). Nat Genet 15: 57–61.

Everett LA, Green ED (1999) A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases. Hum Mol Genet 8: 1883–1891.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000) Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev 52: 513–556.

Falkenstein E, Wehling M (2000) Nongenomically initiated steroid actions. Eur J Clin Invest 30 Suppl 3: 51–54.

Fan J, Chandhoke PS, Grampsas SA (1999) Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. J Am Soc Nephrol 10 Suppl 1: S376–S380.

Fletcher C V, Acosta EP, Strykowski JM, Gudla VC, Canulescu S, Shabadi R, i sur. (1994) Gender differences in human pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Adolesc Health 15: 619–629.

Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ (2008) Non-genomic actions of androgens. Front Neuroendocrinol 29: 169–181.

Foradori CD, Werner SB, Sandau US, Clapp TR, Handa RJ (2007) Activation of the androgen receptor alters the intracellular calcium response to glutamate in primary hippocampal neurons and modulates sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 transcription. Neuroscience 149: 155–164.

Fraga S, Luo Y, Jose PA, Zandi-nejad K, Mount DB, Soares-da-silva P (2006) Dopamine D1-like receptor-mediated inhibition of Cl-/HCO3-exchanger activity in rat intestinal epithelial IEC-6 cells is regulated by G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK 6). Cell Physiol Biochem 18: 347–360.

Freel RW, Hatch M, Green M, Soleimani M (2006) Ileal oxalate absorption and urinary oxalate excretion are enhanced in Slc26a6 null mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G719–G728.

Freel RW, Hatch M, Vaziri N (1994) Intestinal excretion of oxalate in chronic renal failure. J Am Soc Nephrol 5: 1339–1343.

Freel RW, Hatch M, Vaziri ND, Robert W, Hatch M, Vaziri ND (1998) Conductive pathways for chloride and oxalate in rabbit ileal brush-border membrane vesicles. Am J Physiol Cell Physiol 275: C748–C757.

Freel RW, Morozumi M, Hatch M (2009) Parsing apical oxalate exchange in Caco-2BBe1 monolayers: siRNA knockdown of SLC26A6 reveals the role and properties of PAT-1. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 297: G918–G929.

Garcia-Perez I, Villaseñor A, Wijeyesekera A, Posma JM, Stamler J, Aronson P, i sur. (2012) Urinary metabolic phenotyping the slc26a6 (Chloride-oxalate exchanger) null mouse model. J Proteome Res 11: 4425–4435.

Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ (2009) Non-genomic progesterone actions in female reproduction. Hum Reprod Update 15: 119–138.

Gholami K, Muniandy S, Salleh N (2012) Progesterone downregulates oestrogen-induced expression of CFTR and SLC26A6 proteins and mRNA in rats' uteri. J Biomed Biotechnol 2012: 1–7.

Gholami K, Muniandy S, Salleh N (2013) In-vivo functional study on the involvement of CFTR, SLC26A6, NHE-1 and CA isoenzymes II and XII in uterine fluid pH, volume and electrolyte regulation in rats under different sex-steroid influence. Int J Med Sci 10: 1121–1134.

Giafi CF, Rumsby G (1998) Kinetic analysis and tissue distribution of human D-glycerate dehydrogenase/glyoxylate reductase and its relevance to the diagnosis of primary hyperoxaluria type 2. Ann Clin Biochem 35 (Pt 1): 104–109.

Göttlicher M, Heck S, Herrlich P (1998) Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J Mol Med 76: 480–489.

Groves CE, Suhre WB, Cherrington NJ, Wright SH (2006) Sex differences in the mRNA, protein, and functional expression of organic anion transporter (Oat) 1, Oat3, and organic cation transporter (Oct) 2 in rabbit renal proximal tubules. J Pharmacol Exp Ther 316: 743–752.

Halliwell CM, Morgan G, Ou CP, Cass AE (2001) Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. Anal Biochem 295: 257–61.

Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB (1995) Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Drugs 50: 222–239.

Hassan HA, Cheng M, Aronson PS (2012) Cholinergic signaling inhibits oxalate transport by human intestinal T84 cells. Am J Physiol Cell Physiol 302: C46–C58.

Hästbacka J, La Chapelle A De, Mahtani MM, Clines G, Reeve-Daly MP, Daly M, i sur. (1994) The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. Cell 78: 1073–1087.

Hatch M, Freel RW (2005) Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate. Urol Res 33: 1–16.

Hautmann RE (1993) The stomach: a new and powerful oxalate absorption site in man. J Urol 149: 1401–1404.

He L, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. Hum Genomics 3: 195–206.

Hediger MA, Clémençon B, Burrier RE, Bruford EA (2013) The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. Mol Aspects Med 34: 95–107.

Heemers H V, Verhoeven G, Swinnen J V (2006) Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: current insights. Mol Endocrinol 20: 2265–2277.

Hegyi P, Maléth J, Venglovecz V, Rakonczay Z (2011) Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar acid load. Front Physiol 2: 1–3.

Heinlein CA, Chang C (2002a) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr Rev 23: 175–200.

Heinlein CA, Chang C (2002b) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. Mol Endocrinol 16: 2181–2187.

Helboe L, Egebjerg J, Møller M, Thomsen C (2003) Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. Eur J Neurosci 18: 2227–2238.

Heneghan JF, Akhavein A, Salas MJ, Shmukler BE, Karniski LP, Vandorpe DH, i sur. (2010) Regulated transport of sulfate and oxalate by SLC26A2/DTDST. Am J Physiol Cell Physiol 298: C1363–C1375.

Hesse A, Klocke K, Classen A, Vahlensieck W (1987) Age and sex as factors in oxalic acid excretion in healthy persons and calcium oxalate stone patients. Contrib Nephrol 58: 16–20.

Hirose M, Yasui T, Okada A, Hamamoto S, Shimizu H, Itoh Y, i sur. (2010) Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney. Int J Urol 17: 83–92.

Hoglund P, Haila S, Socha J, Tomaszewski L, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg M-L, i sur. (1996) Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. Nat Genet 14: 316–319.

Holmes RP, Assimos DG (1998) Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. J Urol 160: 1617–1624.

Holmes RP, Assimos DG (2004) The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. Urol Res 32: 311–316.

Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG (2001) Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. Kidney Int 59: 270–276.

Holmseth S, Zhou Y, Follin-Arbelet VV, Lehre KP, Bergles DE, Danbolt NC (2012) Specificity controls for immunocytochemistry: the antigen preadsorption test can lead to inaccurate assessment of antibody specificity. J Histochem Cytochem 60: 174–187.

Hoppe B, Beck B, Gatter N, Unruh G von, Tischer A, Hesse A, i sur. (2006) Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. Kidney Int 70: 1305–1311.

Hoseini SS, Sauer MG (2015) Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. J Biol Eng 9: 1–12.

Ignatovich O, Tomlinson IM, Popov A V, Brüggemann M, Winter G (1999) Dominance of intrinsic genetic factors in shaping the human immunoglobulin Vlambda repertoire. J Mol Biol 294: 457–465.

Iguchi M, Takamura C, Umekawa T, Kurita T, Kohri K (1999) Inhibitory effects of female sex hormones on urinary stone formation in rats. Kidney Int 56: 479–485.

Indridason OS, Birgisson S, Edvardsson VO, Sigvaldason H, Sigfusson N, Palsson R (2006) Epidemiology of kidney stones in Iceland: a population-based study. Scand J Urol Nephrol 40: 215–220.

Isenberg JI, Ljungström M, Säfsten B, Flemström G (1993) Proximal duodenal enterocyte transport: evidence for Na(+)-H+ and Cl(-)-HCO3-exchange and NaHCO3 cotransport. Am J Physiol 265: G677–G685.

Isern J, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Meseguer A (2001) Functional analysis and androgen-regulated expression of mouse organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) in the kidney. Biochim Biophys Acta 1518: 73–78.

Ishino S, Ishino Y (2014) DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. Front Microbiol 5: 465.

Ito T, Choi BY, King KA, Zalewski CK, Muskett J, Chattaraj P, i sur. (2011) SLC26A4 genotypes and phenotypes associated with enlargement of the vestibular aqueduct. Cell Physiol Biochem 28: 545–552.

Jackson GC, Mittaz-Crettol L, Taylor JA, Mortier GR, Spranger J, Zabel B, i sur. (2012) Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: a 7-year comprehensive analysis of the known disease genes identify novel and recurrent mutations and provides an accurate assessment of their relative contribution. Hum Mutat 33: 144–157.

Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, i sur. (2013) High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. BMC Biotechnol 13: 52.

Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, Rajendran VM, Velazquez H, Nottoli TP, i sur. (2006) Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. Nat Genet 38: 474–478.

Jiang Z, Grichtchenko II, Boron WF, Aronson PS (2002) Specificity of anion exchange mediated by mouse Slc26a6. J Biol Chem 277: 33963–33967.

Johri N, Cooper B, Robertson W, Choong S, Rickards D, Unwin R (2010) An update and practical guide to renal stone management. Nephron - Clin Pract 116: 159–171.

Johri N, Jaeger P, Robertson W, Choong S, Unwin R (2011) Renal stone disease. Medicine (Baltimore) 35: 415–419.

Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996) Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucleic Acids Res 24: 596–601.

Karniski LP (1998) Effects of sulfate and chloride on three separate oxalate transporters reconstituted from rabbit renal cortex. Am J Physiol Renal Physiol 274: F189–F196.

Karniski LP (2004) Functional expression and cellular distribution of diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene mutations in HEK cells. Hum Mol Genet 13: 2165–2171.

Karniski LP, Lotscher M, Fucentese M, Hilfiker H, Biber J, Murer H (1998) Immunolocalization of sat-1 sulfate/oxalate/bicarbonate anion exchanger in the rat kidney. Am J Physiol Renal Physiol 275: F79–F87.

Kaufhold M, Schulz K, Breljak D, Gupta S, Henjakovic M, Krick W, i sur. (2011) Differential interaction of dicarboxylates with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. AJP Ren Physiol 301: F1026–F1034.

Kere J, Lohi H, Höglund P (1999) Genetic disorders of membrane transport III. Congenital chloride diarrhea. Am J Physiol 276: G7–G13.

Khan SR, Glenton PA (2010) Of mice and men: experimental induction of calcium oxalate nehprolithiasis in mice. J Urol 184: 1189–1196.

Kleinman LI, Loewenstein MS, Goldstein L (1966) Sex difference in the transport of p-aminohippurate by the rat kidney. Endocrinology 78: 403–406.

Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS (2001) Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9425–9430.

Knickelbein RG, Aronson PS, Dobbins JW (1986) Oxalate transport by anion exchange across rabbit ileal brush border. J Clin Invest 77: 170–175.

Ko SBH, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ, i sur. (2002) A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO(3)(-) transport in cystic fibrosis. EMBO J 21: 5662–5672.

Ko SBH, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Hwan K, Linda K, i sur. (2004) Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. Nat Cell Biol 6: 343–351.

Kohri K, Ishikawa Y, Katoh Y, Kataoka K, Iguchi M, Yachiku S, i sur. (1991) Epidemiology of urolithiasis in the elderly. Int Urol Nephrol 23: 413–421.

Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OLM (1986) Excessive crystal agglomeration with low citrate excretion in recurrent stone-formers. Lancet 1: 1056–1058.

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, i sur. (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. Cell 104: 719–730.

Krebs W, Schmidt S V., Goren A, Nardo D De, Labzin L, Bovier A, i sur. (2014) Optimization of transcription factor binding map accuracy utilizing knockout-mouse models. Nucleic Acids Res 42: 13051–13060.

Kujala M, Hihnala S, Tienari J, Kaunisto K, Hästbacka J, Holmberg C, i sur. (2007) Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. Reproduction 133: 775–784.

Kujala M, Tienari J, Lohi H, Elomaa O, Sariola H, Lehtonen E, i sur. (2005) SLC26A6 and SLC26A7 anion exchangers have a distinct distribution in human kidney. Nephron Exp Nephrol 101: e50–e58.

Lamprecht G, Heil A, Baisch S, Lin-Wu E, Yun CC, Kalbacher H, i sur. (2002) The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl-/HCO3\n-exchange to Na+/H+ exchange. Biochemistry 41: 12336–12342.

Ledent P, Duez C, Vanhove M, Lejeune A, Fonzé E, Charlier P, i sur. (1997) Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. FEBS Lett 413: 194–196.

Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S (2012) Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO3-secretion. Physiol Rev 92: 39–74.

Lee S, Hong S, Kim S, Kang S (2011) Ataxin-1 occupies the promoter region of E-cadherin in vivo and activates CtBP2-repressed promoter. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res 1813: 713–722.

Lee YH, Huang WC, Chiang H, Chen MT, Huang JK, Chang LS (1992) Determinant role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. J Urol 147: 1134–1138.

Lee YH, Huang WC, Huang JK, Chang LS (1996) Testosterone enhances whereas estrogen inhibits calcium oxalate stone formation in ethylene glycol treated rats. J Urol 156: 502–505.

Lemann J, Pleuss JA, Worcester EM, Hornick L, Schrab D, Hoffmann RG (1996) Urinary oxalate excretion increases with body size and decreases with increasing dietary calcium intake among healthy adults. Kidney Int 49: 200–208.

Li J, Al-Azzawi F (2009) Mechanism of androgen receptor action. Maturitas 63: 142–148.

Li J, Xia F, Reithmeier R a. F (2014) N-glycosylation and topology of the human SLC26 family of anion transport membrane proteins. Am J Physiol Cell Physiol 306: C943–C960.

Li J, Zhou T, Gao X, Xu C, Sun Y, Peng Y, i sur. (2010) Testosterone and androgen receptor in human nephrolithiasis. JURO 184: 2360–2363.

Liang L, Li L, Tian J, Lee SO, Dang Q, Huang C-K, i sur. (2014) AR enhances kidney stone-CaOx crystal formation via modulation oxalate biosynthesis/oxidative stress. Mol Endocrinol 28: 1291–1303.

Lickteig AJ, Cheng X, Augustine LM, Klaassen CD, Cherrington NJ (2008) Tissue distribution, ontogeny and induction of the transporters Multidrug and toxin extrusion (MATE) 1 and MATE2 mRNA expression levels in mice. Life Sci 83: 59–64.

Lieberherr M, Grosse B, Kachkache M, Balsan S (1993) Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. J Bone Miner Res 8: 1365–1376.

Liebman M, Costa G (2000) Effects of calcium and magnesium on urinary oxalate excretion after oxalate loads. J Urol 163: 1565–1569.

Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM (2015) SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. Nat Rev Drug Discov 14: 543–560.

Lindsjö M, Danielson BG, Fellström B, Ljunghall S (1989) Intestinal oxalate and calcium absorption in recurrent renal stone formers and healthy subjects. Scand J Urol Nephrol 23: 55–59.

Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, i sur. (2003) Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. Hum Mol Genet 12: 1155–1162.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta delta CT method. Methods 25: 402–408.

Lohi H, Kujala M, Kerkelä E, Saarialho-Kere U, Kestilä M, Kere J (2000) Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. Genomics 70: 102–112.

Lohi H, Kujala M, Mäkelä S, Lehtonen E, Kestilä M, Saarialho-Kere U, i sur. (2002) Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. J Biol Chem 277: 14246–14254.

Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, Heil A, Kujala M, Seidler U, i sur. (2003) Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. Am J Physiol Cell Physiol 284: C769–C779.

Lonard DM, Lanz RB, O'Malley BW (2007) Nuclear receptor coregulators and human disease. Endocr Rev 28: 575–587.

Lösel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. Trends Endocrinol Metab 4: 46–56.

Lu R, Kanai N, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL (1996) Regulation of renal oatp mRNA expression by testosterone. Am J Physiol 270: F332–F337.

Ljubojević M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, i sur. (2007) Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. Am J Physiol Renal Physiol 292: F361–F372.

Ljubojević M, Herak-Kramberger CM, Hagos Y, Bahn A, Endou H, Burckhardt G, i sur. (2004) Rat renal cortical OAT1 and OAT3 exhibit gender differences determined by both androgen stimulation and estrogen inhibition. Am J Physiol Renal Physiol 287: F124–38.

Ljunghall S, Danielson BG (1984) A prospective study of renal stone recurrences. Br J Urol 56: 122–124.

Maher JM, Slitt AL, Cherrington NJ, Cheng X, Klaassen CD (2005) Resistance-associated protein (Mrp) family in mice. Drug Metab Dispos 33: 947–955.

Majorek KA, Kuhn ML, Chruszcz M, Anderson WF, Minor W (2014) Double trouble - Buffer selection and his-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. Protein Sci 23: 1359–1368.

Mandel NS, Mandel GS (1989) Urinary tract stone disease in the United States veteran population. II. Geographical analysis of variations in composition. J Urol 142: 1516–1521.

Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and ophan receptors. Cell 83: 841–850.

Marengo SR, Romani AMP (2008) Oxalate in renal stone disease: the terminal metabolite that just won't go away. Nat Clin Pract Nephrol 4: 368–77.

Markovich D (2001) Physiological roles and regulation of mammalian sulfate transporters. Physiol Rev 81: 1499–1533.

Markovich D (2011) Physiological roles of renal anion transporters NaS1 and Sat1. Am J Physiol Renal Physiol 300: F1267–F1270.

Markovich D, Aronson PS (2007) Specificity and regulation of renal sulfate transporters. Annu Rev Physiol 69: 361–375.

Mattison DR (2013) Pharmacokinetics in real life: sex and gender differences. J Popul Ther Clin Pharmacol 20: e340–e349.

Meier PJ, Knickelbein R, Moseley RH, Dobbins JW, Boyer JL (1985) Evidence for carrier-mediated chloride/bicarbonate exchange in canalicular rat liver plasma membrane vesicles. J Clin Invest 75: 1256–1263.

Migliaccio A, Castoria G, Domenico M Di, Falco A de, Bilancio A, Lombardi M, i sur. (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. EMBO J 19: 5406–5417.

Migliaccio A, Domenico M Di, Castoria G, Falco A de, Bontempo P, Nola E, i sur. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. EMBO J 15: 1292–1300.

Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Domenico M Di, Bilancio A, Lombardi M, i sur. (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. EMBO J 17: 2008–2018.

Milliner D (2006) Treatment of the primary hyperoxalurias: a new chapter. Kidney Int 70: 1198–1200.

Monico CG, Rossetti S, Belostotsky R, Cogal AG, Herges RM, Seide BM, i sur. (2011) Primary hyperoxaluria type III gene HOGA1 (formerly DHDPSL) as a possible risk factor for idiopathic calcium oxalate urolithiasis. Clin J Am Soc Nephrol 6: 2289–2295.

Moriarty K, Kim KH, Bender JR (2006) Estrogen receptor-mediated rapid signaling. Endocrinology 147: 5557–5563.

Morissette M, Biron D, Paolo T Di (1990) Effect of estradiol and progesterone on rat striatal dopamine uptake sites. Brain Res Bull 25: 419–422.

Morris ME, Lee H-J, Predko LM (2003) Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous compounds. Pharmacol Rev 55: 229–240.

Moseley RH, Höglund P, Wu GD, Silberg DG, Haila S, La Chapelle A De, i sur. (1999) Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. Am J Physiol 276: G185–G192.

Mount DB, Romero MF (2004) The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. Pflugers Arch 447: 710–721.

Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, i sur. (1999) A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. J Clin Invest 104: 1353–1361.

Nakagami Y, Favoreto S, Zhen G, Park S-W, Nguyenvu LT, Kuperman DA, i sur. (2008) The epithelial anion transporter pendrin is induced by allergy and rhinovirus infection, regulates airway surface liquid, and increases airway reactivity and inflammation in an asthma model. J Immunol 181: 2203–2210.

Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyama N, i sur. (2008) Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol 180: 6262–6269.

Nilsson S, Ma S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J (2001) Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev 81: 1535–1565.

Nozawa T, Sugiura S, Hashino Y, Tsuji A, Tamai I (2004) Role of anion exchange transporter PAT1 (SLC26A6) in intestinal absorption of organic anions. J Drug Target 12: 97–104.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol Endocrinol 18: 1859–1875.

Ohana E, Shcheynikov N, Moe OW, Muallem S (2013) SLC26A6 and NaDC-1 transporters interact to regulate oxalate and citrate homeostasis. J Am Soc Nephrol 24: 1617–1626.

Ohana E, Shcheynikov N, Yang D, So I, Muallem S (2011) Determinants of coupled transport and uncoupled current by the electrogenic SLC26 transporters. J Gen Physiol 137: 239–251.

Orzes N, Bellentani S, Aldini R, Simoni P, Ferretti I, Lunazzi GC, i sur. (1985) Sex differences in the hepatic uptake of sulphobromophthalein in the rat. Clin Sci (Lond) 69: 587–593.

Pak CY (1994) Citrate and renal calculi: an update. Miner Electrolyte Metab 20: 371–377.

Pak CYC, Arnold LH (1975) Heterogeneous nucleation of calcium oxalate by seeds of monosodium urate. Proc Soc Exp Biol Med 149: 930–932.

Petrović S, Ju X, Barone S, Seidler U, Alper SL, Lohi H, i sur. (2003a) Identification of a basolateral Cl-/HCO3 - exchanger specific to gastric parietal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284: 1093–1103.

Petrović S, Ma L, Wang Z, Soleimani M (2003b) Identification of an apical Cl-/HCO-3 exchanger in rat kidney proximal tubule. Am J Physiol Cell Physiol 285: C608–C617.

Petrović S, Wang Z, Ma L, Seidler U, Forte JG, Shull GE, i sur. (2002) Colocalization of the apical Cl-/HCO3- exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G1207–G1216.

Pierucci-Alves F, Akoyev V, Stewart JC, Wang L-H, Janardhan KS, Schultz BD (2011) Swine models of cystic fibrosis reveal male reproductive tract phenotype at birth. Biol Reprod 85: 442–451.

Pogačić V, Dragon F, Filipowicz W (2000) Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. Mol Cell Biol 20: 9028–9040.

Popović M, Zaja R, Fent K, Smital T (2013) Molecular characterization of zebrafish Oatp1d1 (Slco1d1), a novel organic anion-transporting polypeptide. J Biol Chem 288: 33894–33911.

Preminger GM (1992) Renal calculi: pathogenesis, diagnosis, and medical therapy. Semin Nephrol 12: 200–216.

Prenen JA, Boer P, Dorhout Mees EJ (1984) Absorption kinetics of oxalate from oxalate-rich food in man. Am J Clin Nutr 40: 1007–1010.

Quigley CA, Bellis A De, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. Endocr Rev 16: 271–321.

Ramaswamy K, Shah O (2014) Metabolic syndrome and nephrolithiasis. Transl Androl Urol 3: 285–295.

Revelli A, Massobrio M, Tesarik J (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. Endocr Rev 19: 3–17.

Reynolds CD, Smith GD, Jefferson TS, Lugo JN (2015) Comparison of equivalence between two commercially available S499-phosphorylated FMRP antibodies in mice. PLoS One 10: e0143134.

Romero V, Akpinar H, Assimos DG (2010) Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. Rev Urol 12: e86–e96.

Rossmann H, Jacob P, Baisch S, Hassoun R, Meier J, Natour D, i sur. (2005) The CFTR associated protein CAP70 interacts with the apical Cl-/HCO3- exchanger DRA in rabbit small intestinal mucosa. Biochemistry 44: 4477–4487.

Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, i sur. (1999) Regulation of androgen action. Vitam Horm 55: 309–52.

Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, i sur. (2001) Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4221–4226.

Sabolić I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G (2007) Gender differences in kidney function. Pflugers Arch Eur J Physiol 455: 397–429.

Sabolić I, Breljak D, Ljubojević M, Brzica H (2011) Are mice, rats, and rabbits good models for physiological, pharamacological and toxicological studies in humans? Peroiodicum Biol 113: 7–16.

Sabolić I, Škarica M, Gorboulev V, Ljubojević M, Balen D, Herak-Kramberger CM, i sur. (2006) Rat renal glucose transporter SGLT1 exhibits zonal distribution and androgen-dependent gender differences. Am J Physiol Renal Physiol 290: F913–F926.

Sabolić I, Vrhovac I, Eror DB, Gerasimova M, Rose M, Breljak D, i sur. (2012) Expression of Na+-D-glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences. AJP Cell Physiol 302: C1174–C1188.

Säfsten B (1993) Duodenal bicarbonate secretion and mucosal protection. Neurohumoral influence and transport mechanisms. Acta Physiol Scand Suppl 613: 1–43.

Saier MH, Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, i sur. (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr 1422: 1–56.

Sakhaee K (2008) Nephrolithiasis as a systemic disorder. Curr Opin Nephrol Hypertens 17: 304–309.

Sakhaee K (2009) Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. Kidney Int 75: 585–595.

Sakhaee K, Maalouf NM, Kumar R, Pasch A, Moe OW (2011) Nephrolithiasis-associated bone disease: pathogenesis and treatment options. Kidney Int 79: 393–403.

Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B (2012) Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. J Clin Endocrinol Metab 97: 1847–1860.

Sakhaee K, Nicar MJ, Brater DC, Pak CYC (1985) Exaggerated natriuretic and calciuric responses to hydrochlorothiazide in renal hypercalciuria but not in absorptive hypercalciuria. J Clin Endocrinol Metab 61: 825–829.

Sambrook J, Russell DW (2006) Calcium-phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells with plasmid DNAs. CSH Protocols 2006

Sambrook JF, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1–22.

Saper CB (2009) A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. J Histochem Cytochem 57: 1–5.

Sarkissian A, Babloyan A, Arikyants N, Hesse A, Blau N, Leumann E (2001) Pediatric urolithiasis in Armenia: a study of 198 patients observed from 1991 to 1999. Pediatr Nephrol 16: 728–732.

Sas DJ, Hulsey TC, Shatat IF, Orak JK (2010) Increasing incidence of kidney stones in children evaluated in the emergency department. J Pediatr 157: 132–137.

Schlessinger A, Yee SW, Sali A, Giacomini KM (2013) SLC classification: an update. Clin Pharmacol Ther 94: 19–23.

Schnedler N, Burckhardt G, Burckhardt BC (2011) Glyoxylate is a substrate of the sulfate-oxalate exchanger, sat-1, and increases its expression in HepG2 cells. J Hepatol 54: 513–520.

Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS (1993) Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 4166–4170.

Schweinfest CW, Spyropoulos DD, Henderson KW, Kim J-H, Chapman JM, Barone S, i sur. (2006) slc26a3 (dra)-deficient mice display chloride-losing diarrhea, enhanced colonic proliferation, and distinct up-regulation of ion transporters in the colon. J Biol Chem 281: 37962–37971.

Sharma AK, Rigby AC, Alper SL (2011) STAS domain structure and function. Cell Physiol Biochem 28: 407–22.

Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SBH, Dorwart MR, Naruse S, i sur. (2006) Coupling modes and stoichiometry of Cl-/HCO3-exchange by slc26a3 and slc26a6. J Gen Physiol 127: 511–524.

Sheffield VC, Kraiem Z, Beck JC, Nishimura D, Stone EM, Salameh M, i sur. (1996) Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid organification. Nat Genet 12: 424–426.

Sibug R, Küppers E, Beyer C, Maxson SC, Pilgrim C, Reisert I (1996) Genotype-dependent sex differentiation of dopaminergic neurons in primary cultures of embryonic mouse brain. Brain Res Dev Brain Res 93: 136–142.

Simão S, Gomes P, Pinho MJ, Soares-da-Silva P (2013) Identification of SLC26A transporters involved in the Cl−/HCO3−exchange in proximal tubular cells from WKY and SHR. Life Sci 93: 435–440.

Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Bowman S, Wolkoff A, Sutherland E (1999) Characterization of the mechanisms involved in the gender differences in hepatic taurocholate uptake. Am J Physiol 276: G556–G565.

Singla A, Dwivedi A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, i sur. (2010) Mechanisms of lysophosphatidic acid (LPA) mediated stimulation of intestinal apical Cl-/OH-exchange. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 298: G182–G189.

So H-C, Fong PY, Chen RYL, Hui TCK, Ng MYM, Cherny SS, i sur. (2010) Identification of neuroglycan C and interacting partners as potential susceptibility genes for schizophrenia in a Southern Chinese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 153B: 103–113.

Soldin OP, Mattison DR (2009) Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacokinet 48: 143–157.

Soleimani M (2001) Molecular physiology of the renal chloride-formate exchanger. Curr Opin Nephrol Hypertens 10: 677–683.

Song Y, Yamamoto A, Steward MC, Ko SBH, Stewart AK, Soleimani M, i sur. (2012) Deletion of Slc26a6 alters the stoichiometry of apical Cl-/HCO Formula exchange in mouse pancreatic duct. Am J Physiol Cell Physiol 303: C815–C824.

Soucie JM, Thun MJ, Coates RJ, McClellan W, Austin H (1994) Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States. Kidney Int 46: 893–899.

Spivacow FR, Negri AL, Valle EE del, Calviño I, Fradinger E, Zanchetta JR (2008) Metabolic risk factors in children with kidney stone disease. Pediatr Nephrol 23: 1129–1133.

Stamatiou KN, Karanasiou VI, Lacroix RE, Kavouras NG, Papadimitriou VT, Chlopsios C, i sur. (2006) Prevalence of urolithiasis in rural Thebes, Greece. Rural Remote Health 6: 610–618.

Steward MC, Ishiguro H (2009) Molecular and cellular regulation of pancreatic duct cell function. Curr Opin Gastroenterol 25: 447–453.

Stewart AK, Shmukler BE, Vandorpe DH, Reimold F, Heneghan JF, Nakakuki M, i sur. (2011) SLC26 anion exchangers of guinea pig pancreatic duct: molecular cloning and functional characterization. Am J Physiol Cell Physiol 301: C289–C303.

Sun H, Luo H, Wang N, Ou X, Wen X, Jiang Y, i sur. (2012) Expression and purification of human recombinant LC3 in E.coli and preparation of its polyclonal antibodies. Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi 29: 511–514.

Sutton RAL, Walker VR (1980) Responses to hydrochlorothiazide and acetazolamide in patients with calcium stones. N Engl J Med 302: 709–713.

Tanaka Y, Slitt AL, Leazer TM, Maher JM, Klaassen CD (2005) Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice. Biochem Biophys Res Commun 326: 181–187.

Taraborrelli S (2015) Physiology, production and action of progesterone. Acta Obstet Gynecol Scand 94: 8–16.

Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC (2005) Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis. Kidney Int 68: 1230–1235.

Terada T, Masuda S, Asaka J, Tsuda M, Katsura T, Inui K (2006) Molecular cloning, functional characterization and tissue distribution of rat H+/organic cation antiporter MATE1. Pharm Res 23: 1696–1701.

Thomas M, Klibanov AM (2002) Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 14640–14645.

Tom R, Bisson L, Durocher Y (2008) Transfection of HEK293-EBNA1 cells in suspension with linear PEI for production of recombinant proteins. Cold Spring Harb Protoc 3: 1–5.

Toure A, Lhuillier P, Gossen JA, Kuil CW, Lhote D, Jegou B, i sur. (2007) The testis anion transporter 1 (Slc26a8) is required for sperm terminal differentiation and male fertility in the mouse. Hum Mol Genet 16: 1783–1793.

Uhland-Smith A, DeLuca HF (1993) 1,25-dihydroxycholecalciferol analogs cannot replace vitamin D in normocalcemic male rats. J Nutr 123: 1777–1785.

Urakami Y, Nakamura N, Takahashi K, Okuda M, Saito H, Hashimoto Y, i sur. (1999) Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. FEBS Lett 461: 339–342.

Urakami Y, Okuda M, Saito H, Inui K (2000) Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. FEBS Lett 473: 173–176.

Uribarri J, Oh MSS, Carroll HJ (1989) The first kidney stone. Ann Intern Med 111: 1006–1009.

Vahlensieck EW, Bach D, Hesse A (1982) Incidence, prevalence and mortality of urolithiasis in the German Federal Republic. Urol Res 10: 161–164.

Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V (1999) Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. EMBO J 18: 4270–4279.

VanDervoort K, Wiesen J, Frank R, Vento S, Crosby V, Chandra M, i sur. (2007) Urolithiasis in pediatric patients: a single center study of incidence, clinical presentation and outcome. J Urol 177: 2300–2305.

Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. Hum Genomics 3: 281–290.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, i sur. (2001) The sequence of the human genome. Sci (Washington, DC, United States) 291: 1304–1351.

Vrhovac I, Balen Eror D, Klessen D, Burger C, Breljak D, Kraus O, i sur. (2015) Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. Pflugers Arch 467: 1–18.

Waldegger S, Moschen I, Ramirez A, Smith RJ, Ayadi H, Lang F, i sur. (2001) Cloning and characterization of SLC26A6, a novel member of the solute carrier 26 gene family. Genomics 72: 43–50.

Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). FEBS Lett 427: 103–108.

Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. Cell 103: 169–179.

Wang T, Egbert AL, Abbiati T, Aronson PS, Giebisch G (1996) Mechanisms of stimulation of proximal tubule chloride transport by formate and oxalate. Am J Physiol 271: F446–F450.

Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M, Horn PB Vander (2004) A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. Nucleic Acids Res 32: 1197–1207.

Wang Y, Soyombo A a, Shcheynikov N, Zeng W, Dorwart MR, Marino CR, i sur. (2006) Slc26a6 regulates CFTR activity in vivo to determine pancreatic duct HCO3- secretion: relevance to cystic fibrosis. EMBO J 25: 5049–5057.

Wang Z, Petrović S, Mann E, Soleimani M, Petrovic S, Mann E, i sur. (2002) Identification of an apical Cl(-)/HCO3(-) exchanger in the small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282: G573–G579.

Wang Z, Wang T, Petrović S, Tuo B, Riederer B, Barone SL, i sur. (2005) Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. Am J Physiol Cell Physiol 288: C957–C965.

Watson JM, Shrewsberry AB, Taghechian S, Goodman M, Pattaras JG, Ritenour CWM, i sur. (2010) Serum testosterone may be associated with calcium oxalate urolithogenesis. J Endourol 24: 1183–1187.

Watts RWE (2005) Idiopathic urinary stone disease: possible polygenic aetiological factors. QJM 98: 241–246.

Wedenoja S, Pekansaari E, Höglund P, Mäkelä S, Holmberg C, Kere J (2011) Update on SLC26A3 mutations in congenital chloride diarrhea. Hum Mutat 32: 715–722.

Wehling M (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. Annu Rev Physiol 59: 365–393.

Wehling M, Schultz A, Lösel R (2006) Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology. Maturitas 54: 321–326.

Whittamore JM, Freel RW, Hatch M (2013) Sulfate secretion and chloride absorption are mediated by the anion exchanger DRA (Slc26a3) in the mouse cecum. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 305: G172–G184.

Williams AW, Wilson DM (1990) Dietary intake, absorption, metabolism, and excretion of oxalate. Semin Nephrol 10: 2–8.

Worcester EM, Coe FL (2008) New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria. Semin Nephrol 28: 120–132.

Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB, Michael F (2002) Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. Am J Physiol Renal Physiol 283: F826–F838.

Xu J, Song P, Nakamura S, Miller M, Barone S, Alper SL, i sur. (2009) Deletion of the chloride transporter slc26a7 causes distal renal tubular acidosis and impairs gastric acid secretion. J Biol Chem 284: 29470–29479.

Yagisawa T, Ito F, Osaka Y, Amano H, Kobayashi C, Toma H (2001) The influence of sex hormones on renal osteopontin expression and urinary constituents in experimental urolithiasis. J Urol 166: 1078–1082.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13: 134–145.

Yoon JS, Park H-J, Yoo S-Y, Namkung W, Jo MJ, Koo SK, i sur. (2008) Heterogeneity in the processing defect of SLC26A4 mutants. J Med Genet 45: 411–419.

Yoshida O, Okada Y (1990) Epidemiology of urolithiasis in Japan: a chronological and geographical study. Urol Int 45: 104–111.

Yoshioka I, Tsujihata M, Momohara C, Akanae W, Nonomura N, Okuyama A (2010) Effect of sex hormones on crystal formation in a stone-forming rat model. Urology 75: 907–913.

Zuo J, Khan A, Glenton PA, Khan SR (2011) Effect of NADPH oxidase inhibition on the expression of kidney injury molecule and calcium oxalate crystal deposition in hydroxy-L-proline-induced hyperoxaluria in the male Sprague-Dawley rats. Nephrol Dial Transplant 26: 1785–1796.

Web izvori:

- http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
  - Primer3 (v. 0.4.0)
- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

  Nucleotide BLAST
- http://datasheets.scbt.com/sc-26728.pdf.
  - Podaci proizvođača o karakteristikama protutijela sc-26728 za detekciju proteina SLC26A6/Slc26a6
- http://imagej.nih.gov/ij/
  - ImageJ
- http://www.adobe.com
  - Adobe Photoshop 6.0
- http://www.ebi.ac.uk/
  - BioEdit (v.7.0.9.0)
  - ClustalW
- http://www.lifetechnologies.com
  - *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*

8. POPIS KRATICA

Ab	*Antibody;* **protutijelo**
ARKO	*Androgen Receptor Knock Out*; **miševi s inaktiviranim genom za androgenski receptor**
AGAT	**Alanin-glioksilat aminotransferaza**
AMRC	*Apical mitohondria-rich cells;* **apikalno smještene stanice bogate mitohondrijima**
ANOVA	*Analysis of variance*; **analiza varijance**
AP-1	*Activator protein-1*; **aktivacijski protein-1**
APS	*Ammonium persulfate*; **amonij persulfat**
AR	*Androgen Receptor*; **receptor za androgene**
ARE	*Androgen Response Element;* **mjesto za vezanje androgena**
ABC	*ATP-binding casettes*; **ATP-vežući kazetni prijenosnici**
BBM	*Brush-border membrane*; **četkasta membrana**
BCIP	*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*; **5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat**
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*; **alat za sravnjivanje i usporedbu nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova**
BLM	*Basolateral membrane;* **bazolateralna membrana**
BSA	*Bovine serum albumin*; **albumin goveđeg seruma**
cDNA	*Complementary deoxyribonucleic acid*; **komplementarna deoksiribonukleinska kiselina**
COS (1, 7)	*CV-1 in Origin with SV40 genes;* **stanice porijeklom od CV-1 stanične linije (stanice bubrega afričkog zelenog majmuna) koje posjeduju genetski materijal virusa SV40**
DAG-CY3	*Donkey anti goat-CY3*; **magareće protutijelo protiv kozjeg imunoglobulina klase G obilježeno fluorescencijskom bojom CY3**
DHT	**Dihidrotestosteron**
DIDS	*4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid;* **4,4'-Diizotiocijano-2,2'-stilbendisulfonska kiselina**
Dra	*Downregulated in adenoma;* **protein čija je ekspresija snižena u adenomu**
deH_2O	**Destilirana voda**

DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*; **Dulbeccov modificirani Eagle hranjivi medij**
DNA	*Deoxyribonucleic acid*; **deoksiribonukleinska kiselina**
dNTP	*Deoxynucleotide triphosphate*; **deoksinukleotid trifosfat**
CFTR	*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator;* **transmembranski regulator cistične fibroze**
CLD	*Chloride anion exchanger;* **izmjenivač aniona klora**
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*; **etilen diamin tetraoctena kiselina**
ER	*Estrogen Receptor*; **estrogenski receptor**
ERE	*Estrogen Response Elements*; **mjesto za vezanje estrogena**
ERK1/2	*Extracellular-signal-regulated kinases* 1/2; **kinaze regulirane izvanstaničnim signalima**
F	*Forward;* **početnica komplementarna 5' kraju**
FBS	*Fetal Bovine Serum*; **serum neokoćenog teleta**
GAM-AP	*Goat anti mouse-alkaline phosphatase*; **kozje protutijelo protiv mišjeg imunoglobulina klase G obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom**
GAM-FITC	*Goat anti mouse-fluorescein isothiocyanate*; **kozje protutijelo protiv mišjeg imunoglobulina klase G obilježeno fluorescencijskom bojom fluorescein izotiocijanatom**
GRHPR	**Glioksilat reduktaza/hidroksipiruvat reduktaze**
HEK293	*Human embrionic kidney cells 293*; **stanična linija bubrega ljudskog embrija 293**
IgG	*Immunoglobulin G*; **imunoglobulin klase G**
kb	*Kilobase*; **kilobaza**
kDa	**Kilodalton**
KO	*Knock-out;* **organizam kojemu je određeni gen inaktiviran**
LB	**Luria Bertani**
MAPK	*Mitogen-Activated Protein Kinase*; **mitogenom aktivirane protein kinaze**
MDCK	*Madin-Darby Canine Kidney cells*; **stanice psećeg bubrega**
Mdr	*Multidrug resistance protein;* **protein otpornosti na različite lijekove**

Mrp	*Multidrug resistance-associated protein*; **protein povezan s otpornošću na različite lijekove**
MSC	*Multiple cloning site;* **mjesto za višestruko kloniranje**
Mr	*Relative molecular mass*; **relativna molekulska masa**
mRNA	*Messenger ribonucleic acid*; **glasnička ribonukleinska kiselina**
Na/K-ATPasa	*Sodium-potassium adenosine triphosphatase*; **Na/K-adenozin trifosfataza**
NBT	*Nitro blue tetrazolium chloride*; **nitro plavi tetrazolium klorid**
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*; **Nacionalni centar za biotehnološke informacije**
NTC	*No template control*; **kontrola koja ne sadrži kalup DNA**
OD	*Optical density*; **optička gustoća**
ORF	*Open Reading Frame*; **okvir čitanja**
Pat-1	*Putative anion transporter-1*; **pretpostavljeni prijenosnik aniona-1**
pb	*Base pairs*; **parovi baza**
PBS	*Phosphate buffered saline*; **fosfatni pufer**
PCR	*Polymerase chain reaction*; **lančana reakcija polimerazom**
PEI	*Polyethylenimine*; **polietilenimin**
PMSF	*Phenylmethylsulfonyl fluoride*; **fenil-metil-sulfonil fluorid**
PR	*Progesterone Receptor*; **progesteronski receptor**
PRE	*Progesteron Resposne Element; mjesto vezanja za progeteron*
PT	*Proximal tubule*; **proksimalni kanalić**
PV	*Portal Vein*; **portalna vena**
PVDF	*Polyvinylidene fluoride*; **poliviniliden fluorid**
qPCR	*Quantitative real-time polymerase chain reaction*; **kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu**
R	*Reverse;* **početnica komplementarna 3' kraju**
RAG-AP	*Rabbit anti goat-alkaline phosphatase*; **kunićje protutijelo protiv kozjeg IgG obilježeno enzimom alkalnom fosfatazom**
rCfex	*rat Chloride/formate exchanger*; **izmjenjivač iona klora i mravlje kiseline u štakora**
rHprt1	*rat Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*; **hipoksantin gvanin fosforibozil transferaza 1 u štakora**

rMoMuLV RT	*Recombinant Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*; **rekombinantna reverzna transkriptaza rekombinantnog virusa mišje leukemije**
rRNA	*ribosomal ribonucleic acid;* **ribosomska RNA**
RT	*Reverse transcription*; **reverzna transkripcija**
RT-PCR	*Reverse transcription polymerase chain reaction*; **reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom**
S	*Segment*; **odsječak proksimalnih kanalića**
Sat1-1	*Sulfate anion transporter-1;* **prijenosnik sulfatnog aniona 1**
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*; **natrij dodecil sulfat**
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid gel electrophoresis*; **natrij dodecil sulfat elektroforeza u gelu poliakrilamida**
SLC/Slc	*Solute carrier family;* **nadobitelj prijenosnika otopljenih tvari**
STAS	*Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist*; **prijenosnik sulfata i antagonist čimbenika antisigma**
TAE	*Tris-acetate-EDTA*; **tris-acetat-etilendiamin tetraoctena kiselina**
***Taq* DNA pol**	*Thermus aquaticus DNA polymerase*; **DNA polimeraza iz bakterije *Thermus aquaticus***
TCM	*Total cell membrane*; **ukupne stanične membrane**
TEMED	*Tetramethylethylenediamine*; **tetra-metil-etilen-diamin**
TM	*Transmembrane*; **transmembranski**

9. ŽIVOTOPIS

Dean Karaica je rođen 23. 07. 1987. u Zagrebu gdje je završio osnovnu školu te Prirodoslovno-matematičku gimnaziju (V.). Godine 2006. upisao je preddiplomski studij Biologije, potom i diplomski studij Eksperimentalne biologije (modul: Fiziologija i imunobiologija) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2011. god., a od 01. 02. 2012. godine zaposlen je na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) u Zagrebu kao znanstveni novak/asistent u Jedinici za molekulsku toksikologiju čiji je voditelj tada bio dr. sc. Ivan Sabolić, dr. med., a sada je dr. sc. Davorka Breljak (mentorica). Poslijediplomski doktorski studij Biologije na PMF-u Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2012. godine. Autor i koautor je 3 znanstvena rada indeksirana u bibliografskoj bazi podataka *Current Contents* i više od 20 kongresnih priopćenja. Govori i piše dva strana jezika: engleski i njemački. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama i Hrvatskog herpetološkog društva.

POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

U časopisima indeksiranim u bazi podataka *Current Contents*:

1. Breljak, Davorka; Ljubojević, Marija; Hagos. Yohannes; Micek, Vedran; Balen Eror, Daniela; Vrhovac Madunić, Ivana; Brzica, Hrvoje; Karaica, Dean; Radovic, Nikola; Kraus, Ognjen; Anzai, Naohiko; Koepsell, Hermann; Burckhardt, Gerhard; C. Birgitta, Burckhardt; Sabolić, Ivan. **Distribution of the organic anion transporters NaDC3 and OAT1-3 along the human nephron.** A*merican Journal of Physiology - Renal Physiology* Published (2016), DOI: 10.1152/ajprenal.00113.2016 (članak, znanstveni).

2. Breljak, Davorka; Brzica, Hrvoje; Vrhovac, Ivana; Micek, Vedran; Karaica, Dean; Ljubojević, Marija; Sekovanić, Ankica; Jurasović, Jasna; Rašić, Dubravka; Peraica, Maja; Lovrić, Mila; Schnedler, Nina; Henjakovic, Maja; Wegner, Waja; Burckhardt, Gerhard; Burckhardt, Birgitta C.; Sabolić, Ivan. **In female rats, ethylene glycol treatment elevates protein expression of hepatic and renal oxalate transporter sat-1 (Slc26a1) without inducing hyperoxaluria.** // *Croatian medical journal*. 56 (2015); 447-459 (članak, znanstveni).

3. Herak-Kramberger, Carol Mirna; Breljak, Davorka; Ljubojević, Marija; Matokanovic, Mirela; Lovric, Mila; Rogic, Dunja; Brzica, Hrvoje; Vrhovac, Ivana; Karaica, Dean; Micek, Vedran; Ivkovic Dupor, Jana; Brown, Dennis; Sabolic, Ivan. **Sex-dependent expression of water channel AQP1 along the rat nephron.** // *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 308 (2015), 8; F809-F821 (članak, znanstveni)