

Izražaj gena Stam2 određen na miševima preinačenim genskom zamkom

Ćurlin, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2006

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:165294>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Ćurlin, Marija (2006) *Izražaj gena Stam2 određen na miševima preinačenim genskom zamkom*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/238>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Ćurlin

**Izražaj gena *Stam2* određen na miševima
preinačenim genskom zamkom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2006.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Ćurlin

**Izražaj gena *Stam2* određen na miševima
preinačenim genskom zamkom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurogenetiku i genetiku razvoja
Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u
Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović

Zahvaljujem svom voditelju prof.dr.sc. Srećku Gajoviću na ustrajnoj i stručnoj potpori u cjelokupnom mom radu. Njegovo zauzeto i promišljeno vođenje, te brojni korisni savjeti omogućili su mi da jasno vidim cilj ovog istraživanja i uspješno ga privedem kraju.

Prof.dr.sc. Ljiljani Kostović-Knežević zahvaljujem na stalnoj brizi i vrijednim savjetima koji su širili moje znanstvene vidike. Njezine su stručne primjedbe pridonijele jasnoći i znanstvenoj dorađenosti ovog rada.

Na stalnoj podršci, razumijevanju i suradnji zahvaljujem članovima laboratorija za neurogenetiku i genetiku razvoja, posebno ing.med.lab.dg. Sandri Mavrić čija je temeljitost, pouzdanost i posvećenost laboratorijskom radu značajno unaprijedila eksperimentalni dio ovog rada.

Uvjerenje da znanstveni rad pridonosi ostvarenju općeg dobra temelj je potpore koju mi je pružala moja obitelj. Ta mi je podrška bila stalni izvor snage i inspiracije potrebne za svakodnevno suočavanje s izazovima koje donosi rad u znanosti.

SADRŽAJ

Popis kratica.....	6
1. UVOD.....	8
1.1. Prijenos podražaja i promet membrana u stanici.....	8
1.1.1. Receptori i putevi prijenosa podražaja u stanici.....	9
1.1.2. Endocitoza i usmjeravanje bjelančevina prema lizosomima.....	12
1.1.3. Uloga signalizacije i endocitoze u embrionalnom razvoju.....	13
1.2. STAM2.....	15
1.2.1. Građa i uloga STAM2.....	15
1.3. Proučavanje uloge gena sisavaca.....	17
1.3.1. Proučavanje uloge gena <i>in vitro</i>	17
1.3.2. Proučavanje uloge gena <i>in vivo</i>	18
1.3.2.1. Miš kao pokusni model u istraživanju uloge gena sisavaca.....	18
1.3.2.2. Ciljana preinaka gena.....	19
1.3.2.3. Genska zamka.....	20
1.4. Transgenična mišja linija <i>Stam2</i>^{Gt1Gaj}.....	22
1.4.1. Istraživanje uloge gena <i>Stam2</i>	23
2. HIPOTEZA I CILJ RADA.....	24
2.1. Hipoteza.....	24
2.2. Cilj rada.....	24
2.2.1. Opći ciljevi.....	24
2.2.2. Specifični ciljevi.....	24

3. UZORCI I POSTUPCI.....	25
3.1. Pokusne životinje.....	25
3.2. Postupci za životinjama.....	25
3.2.1. Parenje životinja.....	25
3.2.2. Žrtvovanje životinja.....	25
3.2.3. Izolacija zametaka.....	26
3.2.4. Određivanje starosti zametaka.....	26
3.2.5. Genotipizacija.....	26
3.3. Histokemijsko određivanje aktivnosti β-galaktozidaze.....	26
3.3.1. Fiksacija i rezanje tkiva.....	27
3.3.2. Inkubacija sa supstratom X-gal.....	27
3.3.3. Pohranjivanje obrađenih uzoraka.....	28
3.4. Postupci s DNA.....	28
3.4.1. Izolacija DNA.....	28
3.4.2. Lančana reakcija polimerazom.....	29
3.4.3. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima.....	31
3.4.4. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu.....	31
3.4.5. Sekvencioniranje.....	32
3.4.6. Hibridizacija DNA (Southern blot)	32
3.4.6.1. Označavanje DNA probe za hibridizaciju.....	32
3.4.6.2. Priprema membrane i hibridizacija.....	33
3.5. Postupci s RNA.....	34
3.5.1. Izolacija RNA iz organa odraslog miša.....	34
3.5.2. Elektroforeza RNA na formaldehidnom gelu.....	34
3.5.3. Reverzna transkripcija.....	35
3.5.4. Hibridizacija RNA (northern blot)	35
3.6. Postupci s bjelančevinama.....	36
3.6.1. Priprema tkivnog homogenata.....	36

3.6.2. Određivanje koncentracije bjelančevina Bradford-ovom metodom.....	36
3.6.3. Elektroforeza bjelančevina u poliakrilamidnom gelu.....	37
3.6.4. Imunobojanje bjelančevina (Western blot)	37
4. REZULTATI.....	39
4.1. Transgenična mišja linija <i>Stam2</i>^{Gt1Gaj} - model za istraživanje izražaja gena <i>Stam2</i>.....	39
4.1.1. Genskom zamkom promijenjen je gen <i>Stam2</i> i njegova mRNA.....	39
4.1.1.1. Vektor genske zamke ugrađen je između drugog i trećeg egzona gena <i>Stam2</i>	39
4.1.1.2. Vektor genske zamke ugrađen je u mišji genom u jednoj kopiji.....	39
4.1.1.3. Gen <i>Stam2</i> postoji samo u jednoj kopiji u mišjem genomu.....	41
4.1.1.4. Preinačeni alel gena <i>Stam2</i> prepisuje se u promijenjenu mRNA.....	41
4.1.2. Transkripti normalnog kao ni preinačenog gena <i>Stam2</i> nisu jedinstveni.....	42
4.1.2.1. U homozigotnih nosilaca preinake genskom zamkom prisutan je i normalan transkript gena <i>Stam2</i>	42
4.1.2.2. Postupkom western blot nije potvrđena prisutnost normalne bjelančevine STAM2 kod homozigotnih nosilaca preinake u genu <i>Stam2</i>	44
4.1.2.3. Alternativno prekrajanje odvija se tijekom transkripcije gena <i>Stam2</i>	44
4.2. Izražaj gena <i>Stam2</i>.....	45
4.2.1. Gen <i>Stam2</i> izražen je u svim ispitivanim organima odraslog miša.....	45
4.2.2. Izražaj <i>Stam2</i> u mišjim zamecima postupkom histokemijskog bojanja na enzim β-galaktozidazu.....	47
4.2.2.1. Zameci stari 8,5 dana (E8,5)	47
4.2.2.2. Zameci stari 9,5 dana (E9,5)	48
4.2.2.3. Zameci stari 10,5 dana (E10,5)	50
4.2.2.4. Zameci stari 11,5 dana (E11,5)	51

4.2.2.5. Zameci stari 12,5 dana (E12,5)	53
4.2.2.6. Zameci stari 13,5 dana (E13,5)	54
4.2.2.7. Zameci stari 14,5 dana (E14,5)	56
4.2.2.8. Zameci stari 15,5 dana (E15,5)	58
4.2.2.9. Zameci stari 16,5 dana (E16,5)	60
4.2.2.10. Zameci stari 17,5 dana (E17,5)	64
4.2.2.11. Zameci stari 18,5 dana (E18,5)	67
4.2.2.12. Pregled izražaja <i>Stam2</i> tijekom embrionalnog razvoja.....	70
4.2.3. Izražaj <i>Stam2</i> u mozgu novorođenih i odraslih miševa postupkom histokemijskog bojanja na enzim β -galaktozidazu.....	72
4.2.3.1. Mozak novorođenog miša (P0)	72
4.2.3.2. Mozak odraslog miša.....	74
5. RASPRAVA.....	77
5.1. Transgenična mišja linija <i>Stam2</i>^{Gt1Gaj} - model za istraživanje izražaja gena <i>Stam2</i>.....	77
5.1.1. Genska zamka kao postupak za istraživanje izražaja i uloge gena.....	77
5.1.2. Ugrađeni vektor genske zamke omogućuje praćenje izražaja preinačenog gena <i>Stam2</i>	78
5.1.3. Alternativno prekrajanje transkripta gena <i>Stam2</i>	79
5.2. Izražaj gena <i>Stam2</i>.....	81
5.2.1. Izražaj <i>Stam2</i> tijekom embrionalnog razvoja.....	81
5.2.2. Izražaj <i>Stam2</i> u središnjem živčanom sustavu.....	81
5.2.3. Izražaj i uloga gena <i>Stam2</i>	82
5.2.3.1. STAM2 i unutarstanični prijenos podražaja.....	82
5.2.3.2. STAM2 u endosomskoj regulaciji prijenosa podražaja.....	83
5.2.3.3. STAM2 u embrionalnom razvoju.....	85
5.2.3.3.1. STAM2 u razvoju živčanog sustava.....	88
5.2.3.4. STAM2 u središnjem živčanom sustavu odraslih miševa.....	89
5.3. STAM2 u staničnim zbivanjima vezanim uz zdravlje i bolest.....	90
6. ZAKLJUČCI.....	92

7. SAŽETAK.....	94
8. SUMMARY.....	95
9. POPIS LITERATURE.....	96
10. ŽIVOTOPIS.....	107

POPIS KRATICA

AMSH - *associated molecule with the SH3 domain of STAM*, hrv. molekula povezana s domenom SH3 molekule STAM

ATP - *adenosine triphosphate*, hrv. adenzin trifosfat

BMP - *bone morphogenetic protein*, hrv.

BSA - *bovine serum albumine*, hrv. albumin iz goveđeg seruma

cAMP – *cyclic adenosine monophosphate*, hrv. ciklički adenzin monofosfat

cDNA - *copy DNA*, hrv. komplementarna DNA

cGMP - *cyclic guanosine monophosphate*, hrv. ciklički gvanozin monofosfat

DPP - *Decapentaplegic*

DTT – *dithiotreitol*, hrv. ditiotreitol

EDTA – *etilendiamintetraacetate*, hrv. etilendiamintetraoctena kiselina

EGF - *epidermal growth factor*, hrv. epidermalni čimbenik rasta

EGFR - *epidermal growth factor receptor*, hrv. receptor epidermalnog čimbenika rasta

Eps15 - *EGFR pathway substrate clone no. 15*, hrv. klon br. 15 supstrata biokemijskog puta EGFR

ES - *embryonic stem*, hrv. embrionalna matična

ESCRT - *endosomal sorting complex required for transport*, hrv. kompleks za razvrstavanje u endosomu potreban za transport

FGF - *fibroblast growth factor*, hrv. čimbenik rasta fibroblasta

GDP - *guanosine diphosphate*, hrv. gvanozin difosfat

GM-CSF - *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*, hrv. čimbenik poticanja kolonija granulocita/makrofaga

GTP - *guanosine triphosphate*, hrv. gvanozin trifosfat

HBP - *HRS binding protein*, hrv. bjelančevina koja veže molekulu HRS

HGF - *hepatocyte growth factor*, hrv. hepatocitni čimbenik rasta

HRS - *HGF-regulated tyrosine kinase substrate*, hrv. supstrat za tirozin kinazu reguliranu hepatocitnim čimbenikom rasta

IgE – imunoglobulin E

IL-3 – *interleucine-3*, hrv. interleukin-3

ILAR - *International Laboratory Register*, hrv. Međunarodni Registar Laboratorija

IP3 – *inositol-1,4,5-triphosphate*, hrv. inozitol-1,4,5-trifosfat

ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, hrv. dio bjelančevine odgovoran za aktivaciju imunoreceptorima na osnovi fosforilacije tirozina

JAK - *Janus kinase*, hrv. Janus kinaza

MOPS - *3-(N-morpholino)propansulphonate*, hrv. 3-(N-morfolino)propansulfonska kiselina

mRNA - *messenger RNA*, hrv. glasnička RNA

MVB - *multivesicular body*, hrv. multivezikularno tjelešće

p38MAPK - *p38 mitogen-activated protein kinase*, hrv. protein-kinaza aktivirana mitogenom p38

PBS - *phosphate buffered saline*, hrv. puferirana otopina fosfatnih soli

PDGF - *platelet-derived growth factor*, hrv. trombocitni čimbenik rasta

RACE - *rapid amplification of cDNA ends*, hrv. brzo umnažanje krajeva cDNA

RNAi - *RNA interference*, hrv. interferencija RNA

RT-PCR - *reverse transcription-polymerase chain reaction*, hrv. reverzna transkripcija- lančana reakcija polimerazom

SDS – *sodiumdodecylphosphate*, hrv. natrijdodecilsulfat

SH2 - *Src homology 2*, hrv. domena homologna molekuli Src

SH3 - *Src homology 3*, hrv. domena homologna molekuli Src

shRNAs - *short hairpin RNAs*, hrv. kratke ukosnice RNA

Shh - *Sonic hedgehog*

siRNAs - *small interfering RNAs*, hrv. male interferirajuće RNA

SNAP-25 - *synaptosome-associated protein of 25 kDa*, hrv. bjelančevina veličine 25 kDa povezana sa sinaptosomom

SSM - *STAM-specific motif*, hrv. dio bjelančevine (motiv) specifičan za STAM

STAM - *signal transducing adaptor molecule*, hrv. molekula prilagođivač prijenosa podražaja

STAT - *signal transducers and activators of transcription*, hrv. prijenosnici podražaja i aktivatori transkripcije

TGF- β – *transforming growth factor – β* , hrv. transformirajući čimbenik rasta - β

Tris – *trishydroxymethylaminmetane*, hrv. trishidroksimetilaminometan

UBPY - *ubiquitin isopeptidase Y*, hrv. ubikvitin izopeptidaza Y

UIM - *ubiquitin-interacting motif*, hrv. dio bjelančevine (motiv) koji međudjeluje s ubikvitinom

VHS - Vps-27/Hrs/Stam

Vps - *vacuolar protein sorting*, hrv. molekula koja razvrstava bjelančevine u vakuoli

X-gal - *5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranoside*, hrv. 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

1. UVOD

Premda su osnovni mehanizmi embrionalnog razvoja višestaničnih organizama poznati, još uvijek ostaju zagonetni brojni detalji složenih zbivanja kojima od oplodene jajne stanice nastaje na precizan način mnoštvo različitih stanica. Posebno je zamršen razvoj živčanog sustava gdje se stanice trebaju međusobno povezati i umrežiti kako bi djelovale savršeno usklađeno (1). Što usmjerava diferencijaciju jedne stanice u toliko mnoštvo različitih stanica i kako se postiže tolika raznolikost djelovanja? Proces diferencijacije teče polako i postupno. Na smjer diferencijacije i djelovanje svake pojedinačne stanice utječe njena genetska uputa u suglasju s okolinom. Stanica prima podražaje iz okoline, koje joj šalju druge, susjedne ili udaljenije stanice. Kako će u konačnici podražaj djelovati na ciljnu stanicu i smjer njenog razvoja ovisi o vrsti podražaja i načinu prijenosa do ciljne stanice, njenoj sposobnosti da ga primi, te o načinu primanja i provođenja podražaja u stanicu.

Stanica na zaprimljeni podražaj iz okoline odgovara aktivacijom gena koji će u njoj pokrenuti određene procese (2). Na različite podražaje različite stanice odgovaraju aktivacijom različitih gena, gdje u odgovoru sudjeluje niz signalnih molekula kako na površini tako i unutar stanice. Da bi stanica bila u stanju odgovoriti na specifičan podražaj, signalne molekule su ustrojene u složen sustav koji je osjetljiv na fine razlike u podražajima. Proučavanje signalnih molekula i načina provođenja podražaja kroz stanicu izazov je za mnoge znanstvenike čija istraživanja pridonose razumijevanju normalnog embrionalnog razvoja sisavaca, posebno razvoja živčanog sustava. Poznavanje tih procesa omogućit će razumijevanje etiopatogeneze nekih bolesti nastalih u razvoju živčanog sustava čovjeka. To će u budućnosti biti osnova za liječenje tih bolesti.

Predmet ovog rada je STAM2 (engl. *Signal transducing adaptor molecule*; hrv. molekula prilagođivač prijenosa podražaja), molekula koja sudjeluje u regulaciji prijenosa podražaja kroz stanicu, a pretpostavlja se da je njena uloga važna tijekom embrionalnog razvoja, posebice razvoja živčanog sustava.

1.1. Prijenos podražaja i promet membrana u stanici

Djelovanje pojedinih organa, kao i organizma u cijelini ovisi o stalnoj izmjeni poruka među stanicama. Jedan od načina izmjene poruka su signalne molekule koje prenose podražaj s jedne na drugu stanicu. Ciljne stanice imaju sposobnost prepoznavanja i prihvatanja signalne molekule, te primljeni podražaj proslijediti do ciljnog staničnog odjeljka koji će na taj poticaj

dati odgovarajući odgovor (3). Sve signalne molekule topive u vodi (uključujući neurotransmitere, peptidne hormone i čimbenike rasta) vežu se na specifične receptorske bjelančevine na površini ciljne stanice (4). Receptori prevode izvanstanični podražaj (vezanje liganda) u unutarstanične podražaje koji mijenjaju ponašanje ciljne stanice. Površinski receptori mogu biti vezani uz ionske kanale, G-bjelančevine ili uz enzime.

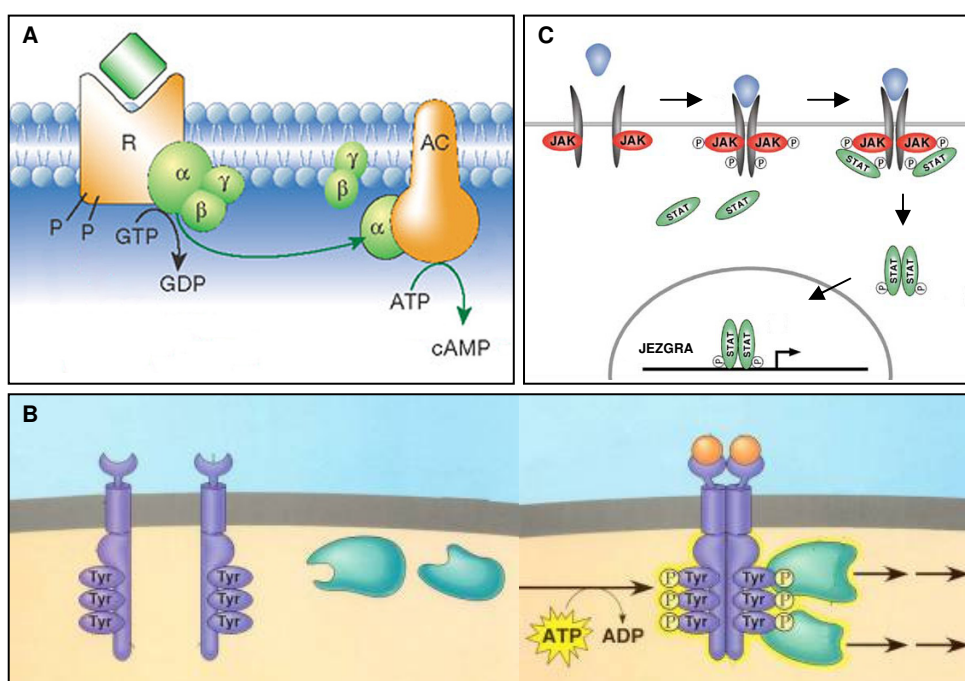
U unutrašnjosti stanice, podražaji se od receptora prenose na različite načine. Svi ti načini uključuju uzastopnu aktivaciju nizvodnih molekula procesom fosforilacije, što dovodi do pojačavanja podražaja (5). U unutarstaničnom prijenosu podražaja važnu ulogu imaju takozvani drugi glasnici, kao što su: ciklički adenzin monofosfat (cAMP), ciklički gvanozin monofosfat (cGMP), Ca^{2+} , diacil-glicerol i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3). (6, 7). Oni nastaju kao odgovor na aktivaciju receptora, brzo difundiraju i šire podražaj u ostale dijelove stanice. Najpoznatiji primjer drugog glasnika je cAMP koji nastaje iz adenzin trifosfata (ATP) djelovanjem adenil-ciklaze koja se aktivira na poticaj adrenalina posredstvom G-bjelančevine (slika 1A) (8). cAMP aktivira dotad neaktivnu protein-kinazu A koja fosforilira “nizvodne” (engl. *downstream*) enzime signalnog puta čiji je cilj razgradnja glikogena.

Pored signalnih bjelančevina i drugih glasnika u procesu prijenosa podražaja unutar stanice sudjeluju i molekule prilagođivači (engl. *adaptors*). Oni sami ne prenose podražaj, već pomoću specifičnih domena za vezanje (napr. domena SH2; engl. *Src homology 2*, regija homologna domeni bjelančevine Src) povezuju dvije signalne molekule i time omogućuju prijenos podražaja (9).

1.1.1. Receptori i putevi prijenosa podražaja u stanicu

Receptori su molekule koje zbog svoje specifične građe mogu prepoznati i vezati određene molekule iz stanične okoline. No, specifičnost prijenosa podražaja nije određena samo građom receptorskog veznog mjesta za signalnu molekulu, već i načinom na koji se taj podražaj prosljeđuje u stanicu. To prije svega ovisi o molekulama unutar stanice s kojima su receptori povezani i kojima predaju primljeni podražaj. Stoga se, ovisno s kojim su molekulama povezani, receptori dijele u nekoliko skupina: receptori povezani s G-bjelančevinama, te receptori povezani s enzimima, koji se opet dijele na receptore s vlastitom tirozin kinaznom aktivnošću (receptorske protein-tirozin-kinaze), receptore vezani na unutarstanične tirozin kinaze, te ostale receptore vezane na druge unutarstanične enzime.

Najveća je porodica receptora povezanih s G-bjelančevinama (8). Oni vežu signalnu molekulu svojom izvanstaničnom domenom, zbog čega dolazi do konformacijske promjene i vezanja citosolne domene receptora za G-bjelančevinu koja se nalazi uz unutrašnju stranu stanične membrane (slika 1A). G-bjelančevinu tada otpušta gvanozin difosfat (GDP) u zamjenu za gvanozin trifosfat (GTP), što potakne podjedinicu G-bjelančevine α na koju je vezan GTP na odvajanje od podjedinica β i γ . Kompleks $\beta\gamma$ i aktivirana podjedinica α djeluju na svoje ciljeve kako bi izazvali unutarstanični odgovor. Hidrolizom vezanoga GTP u GDP, α podjedinica postaje inaktivna te se ponovo spaja s kompleksom $\beta\gamma$. Na taj način inaktivirana G-bjelančevina spremna je za novi ciklus prijenosa podražaja. Receptori povezani s G-bjelančevinama najčešće su receptori za neurotransmitere, neuropeptide i peptidne hormone.



Slika 1. A. Prijenos podražaja s aktiviranog receptora na adenilil ciklazu i ciklički AMP aktivacijom α podjedinice G-bjelančevine. R - receptor; AC - adenilil ciklaza (preuzeto i prilagođeno iz 14). B. Dimerizacija i autofosforilacija receptora s tirozin kinaznom aktivnošću, te posljedična aktivacija unutarstaničnih enzima koji proslijeđuju podražaj unutar stanice (preuzeto i prilagođeno iz 15). C. Signalni put JAK-STAT. Nereceptorska protein-tirozin-kinaza JAK aktivirana nakon vezanja signalne molekule za receptor uzrokuje dimerizaciju i aktivaciju receptora, a potom i aktivaciju transkripcijskog čimbenika STAT koji se premješta u jezgru i potiče transkripciju ciljnih gena (preuzeto i prilagođeno iz 16).

Receptori povezani s enzimima prvotno su bili opisani kroz njihovu ulogu u odgovorima na izvanstanične signalne bjelančevine koje potiču rast, proliferaciju, diferencijaciju i biološku smrt stanica (10, 11). Receptori povezani s enzimima su transmembranske bjelančevine čija se domena za vezanje liganda nalazi na vanjskoj površini plazma membrane. Njihova citoplazmatska domena veže se na unutarstanični enzim ili sama ima enzimsku aktivnost. Primjeri receptora povezanih s enzimima su receptori s vlastitom tirozin kinaznom aktivnošću (receptorske protein-tirozin-kinaze), te receptori vezani na unutarstanične tirozin kinaze (receptori za citokine).

Porodica receptorskih protein-tirozin-kinaza uključuje receptore izravno povezane s unutarstaničnim enzimima koji fosforiliraju bjelančevinske supstrate na tirozinskom ostatku (12). Vezanjem signalne molekule (obično su to polipeptidni čimbenici rasta) dolazi do dimerizacije receptora, a potom i do autofosforilacije receptora, čime se povećava njihova tirozin-kinazna aktivnost (slika 1B). Tako aktivirani receptori vežu signalne molekule smještene unutar stanice, fosforiliraju ih i potiču na aktivnosti kojima se nastavlja unutarstanični prijenos podražaja. Unutarstanične signalne bjelančevine koje se vežu na fosfotirozine na aktiviranim receptorima i na njih vezanim bjelančevinama obično sadrže visoko konzervirane fosfotirozin-vezne domene. Takva je domena SH2 preko koje bjelančevine prepoznaju specifične fosforilirane tirozine. Mnoge signalne bjelančevine također sadrže domenu SH3 (engl. *Src homology 3*), koja se veže na motive bogate prolinom na unutarstaničnim bjelančevinama. Neke signalne bjelančevine sastavljene su od domena SH2 i SH3 i djeluju kao prilagođivači koji spajaju bjelančevine fosforilirane na tirozinu s drugim bjelančevinama koje nemaju vlastite domene SH2 ili SH3.

Receptori za citokine i neke polipeptidne hormone nemaju vlastitu enzimsku aktivnost, no vezanjem signalne molekule na izvanstaničnu domenu receptora aktiviraju se nereceptorske protein-tirozin-kinaze koje su nekovalentno vezane za citosolnu domenu receptora (13). Poput receptorskih protein-tirozin-kinaza, ovi se receptori dimeriziraju nakon vezanja signalne molekule, a potom slijedi dimerizacija i uzajamna fosforilacija nereceptorskih protein-tirozin-kinaza. Aktivirane kinaze fosforiliraju receptore i tako stvaraju fosfotirozinska vezna mjesta za nizvodne signalne molekule sa domenama SH2. Nereceptorske protein-tirozin-kinaze združene s receptorima za citokine pripadaju porodici Janus-kinaza (JAK) (13) (slika 1C). One izravno fosforiliraju i aktiviraju transkripcijske čimbenike STAT (engl. *signal transducers and activators of transcription*; prenosioči podražaja i aktivatori transkripcije). Bjelančevine STAT normalno su

neaktivne. Vezanje citokina ili hormona na receptore uzrokuje njihov prelazak u jezgru gdje aktiviraju transkripciju gena.

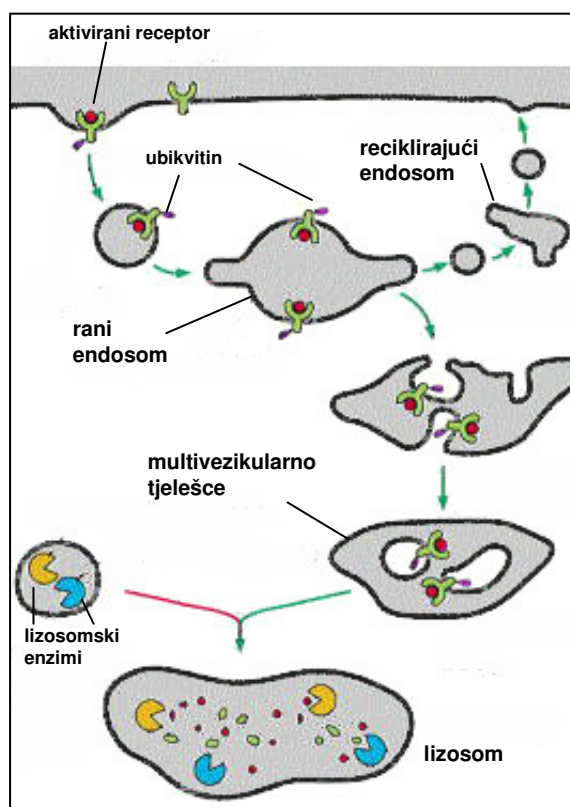
Pored receptora povezanih s protein-tirozin-kinazama, postoje i receptori koji su povezani s drugačijim enzimima, kao što su protein-tirozin-fosfataze, protein-serin/treonin-kinaze i gvanil-ciklaze. Primjer takvih receptora su receptori za transformirajući čimbenik rasta β (TGF- β) koji fosforiliraju serinske ili treoninske ostatke bjelančevinskih supstrata. Posebnost receptora za TGF- β je što ne stvaraju homodimere, već heterodimere s pripadnicima iste porodice receptora, međusobno se fosforiliraju i tako aktivirani fosforiliraju transkripcijske čimbenike nazvane SMAD (SMAD-1 je ljudski homolog bjelančevine Mad nađene kod vinske mušice, a odgovara i genu *Sma* prisutnog kod *Caenorhabditis elegans*) koji u jezgri potiču aktivnost ciljnih gena (17).

1.1.2. Endocitoza i usmjeravanje bjelančevina prema lizosomima

Brojem i vrstom receptora na svojoj površini stanica može regulirati svoju osjetljivost na vanjske podražaje. Isto tako, stanica može ublažiti ili poništiti početni podražaj uklanjanjem aktiviranih receptora sa svoje površine i njihovom razgradnjom u lizosomima (18). Važnu ulogu u takvoj regulaciji ima proces endocitoze posredovane mjehurićima obloženim klatrinom. Pritom se receptori zajedno s vezanim signalnim molekulama uvlače u unutrašnjost stanice, u organele nazvane rani endosomi (19). Pupanjem prema unutra ograničena područja membrane ranih endosoma (gdje se nalaze ugrađeni receptori) stvaraju nove mjehuriće (slika 2). Takav endosom se naziva multivezikularno tjelešće (MVB; engl. *multivesicular body*). Multivezikularno tjelešće potom postaje lizosom ili se stopi s lizosomom gdje nastupa razgradnja receptora i njihovih liganda kiselim hidrolazama. Na taj se način regulira aktivnost receptorskih protein-tirozin-kinaza (20). Međutim, postoje receptori koji na jednak način dospijevaju u rane endosome, iz kojih ne odlaze u lizosome, već se putem reciklirajućih endosoma vraćaju na površinu stanice, oslobođeni signalnih molekula. Primjer takvih receptora su receptori za lipoproteine male gustoće, te željezo-transferin.

Način na koji stanica usmjerava endocitozom uvučene receptore otkriven je u kvascima (21, 22). Ključnu ulogu u prepoznavanju receptora namijenjenih za razgradnju u lizosomima ima vezanje molekula ubikvitina na receptore (21). Za razliku od proteasomske razgradnje bjelančevina za koju je kao znak raspoznavanja potrebno vezanje poliubikvitinskog lanca na bjelančevine namijenjene za razgradnju, tj. poliubikvitinacija, bjelančevine namijenjene razgradnji u lizosomima vežu na sebe pojedinačne molekule ubikvitina na više veznih mjesta, pa se to onda

naziva višestruka monoubikvitinacija, odnosno multiubikvitinacija (23). Takvi multiubikvitinirani receptori okupljaju se na dijelovima membrane ranih endosoma od kojih pupanjem nastaju mjehurići multivezikularnog tjelešca (24). Neposredno prije zatvaranja tih mjehurića multiubikvitinirani receptori otpuštaju molekule ubikvitina kako se i one ne bi razgradile u lizosomima (21).



Slika 2. Shematski prikaz uvlačenja aktiviranih receptora u rane endosome odakle se putem reciklirajućih endosoma vraćaju na površinu stanice ili putem multivezikularnih tjelešaca odlaze u lizosome gdje ih razgrađuju lizosomski enzimi (preuzeto i prilagođeno iz 25).

1.1.3. Uloga signalizacije i endocitoze u embrionalnom razvoju

Diferencijacija stanica ektoderma u stanice živčanog tkiva događa se po istim pravilima kao i diferencijacija drugih vrsta tkiva. Bitan čimbenik u tom procesu je utjecaj okoline, odnosno susjednih stanica. Susjedne stanice šalju nediferenciranim stanicama podražaje bilo izravnim dodirrom, bilo putem signalnih molekula. Jedan od mehanizma prijenosa podražaja izravnim dodirrom je put Delta – Notch. Taj je događaj nazvan lateralna inhibicija kojim stanice malu početnu neravnotežu u jačini prijenosa podražaja pomoću molekule Notch pojačavaju, čime

sprječavaju susjedne stanice da se diferenciraju u istom smjeru (26, 27, 28). Neizravna komunikacija među stanicama odvija se putem signalnih molekula (morfogena). Morfogeni u pravilu ne odlaze daleko od mjesta svog nastajanja, već djeluju samo na najbliže stanice. Velik broj morfogena je evolucijski očuvan i pripada porodicama EGF (engl. *epidermal growth factor*; epidermalni čimbenik rasta), FGF (engl. *fibroblast growth factor*; čimbenik rasta fibroblasta), Ephrin, TGF- β , BMP (engl. *bone morphogenetic protein*) Nodal, Wnt, Hedgehog i Delta (29). Posljedica utjecaja morfogena na ciljnu stanicu je promjena u transkripciji gena. Neki se geni gase, a drugi se aktiviraju, te na taj način nastaju različite stanice, koje opet različito reagiraju na druge morfogene i pritom se još više diferenciraju.

Stanice ne reagiraju samo na prisutnost morfogena, već one različito reagiraju i na njihovu koncentraciju. Gradijent koncentracije morfogena izaziva različitu diferencijaciju stanica ovisno o njihovoj udaljenosti od izvora morfogena. Primjer takvog gradijenta morfogena je utjecaj gradijenta Shh (engl. *Sonic hedgehog protein*) na pravilan razvoj prstiju kod pileta (30).

Važno mjesto u regulaciji indukcije morfogenima tijekom razvoja ima i proces endocitoze. Endocitoza, kao što je već opisano, putem lizosomske razgradnje receptora i ostalih sudionika u unutarstaničnom prijenosu podražaja podešava osjetljivost stanice na vanjske podražaje i određuje trajanje podražaja. Endocitozom se može ubrzati i olakšati unutarstanični prijenos podražaja, kao što je uvlačenje receptora za TGF- β , što olakšava njihovo vezanje za bjelančevine Smad na endosomima, a time i prosljeđivanje podražaja (31).

Endocitoza ima ulogu u stvaranju gradijenta morfogena. Endocitotskim uvlačenjem morfogena (porodica BMP, Hedgehog i Wnt) i njihovom razgradnjom u lizosomima ograničava se gradijent morfogena na određeno područje, te dolazi do asimetričnog rasporeda morfogena. Isto tako, dio morfogena se nakon endocitoze može vratiti na površinu stanice, dok se dio razgrađuje u lizosomima, pa njihov različit omjer može usmjeriti slične stanice u različite razvojne pravce (32). Neki se morfogeni putem transporta membrane prenose s jedne na drugu stranu stanice procesom transcitoze, pa različit intenzitet takvog transporta može stvoriti umjetni gradijent morfogena (31).

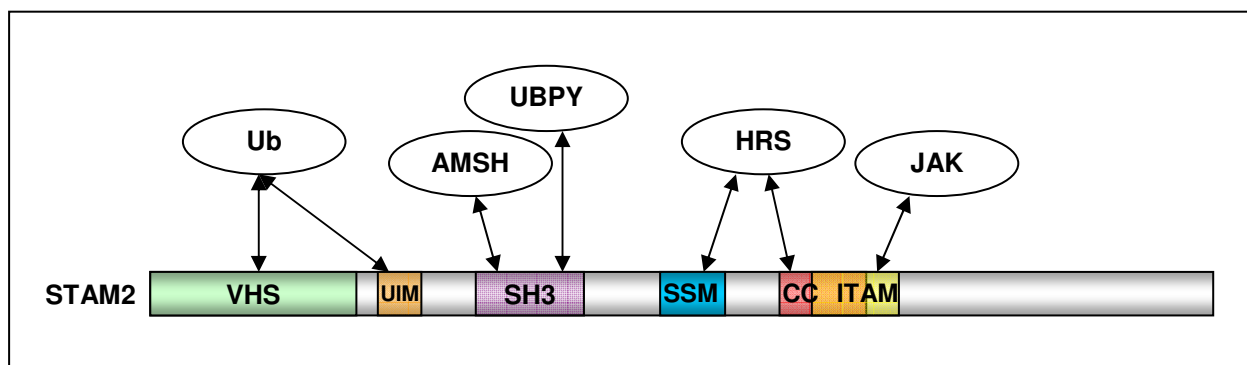
1.2. STAM2

Molekulu STAM2 gotovo su istovremeno otkrile četiri nezavisne istraživačke grupe. Pandey i suradnici otkrili su bjelančevinu STAM2 tražeći u HeLa stanicama fosforilirane supstrate receptora čimbenika rasta epidermisa (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*) postupkom afinitetne purifikacije upotrebom protutijela na fosfotirozin, te identifikacijom bjelančevina na temelju masene spektrometrije (33). Analizom građe te bjelančevine otkrili su da je vrlo slična bjelančevini STAM koja je već otprije bila poznata (34). Endo i suradnici pronašli su i sekvencionirali glasničku RNA (mRNA, engl. *messenger RNA*) gena *Stam2* tražeći u banci komplementarnih DNA (cDNA, engl. *copy DNA*) iz ljudskog fetalnog mozga molekule slične molekuli STAM (naknadno prozvanj STAM1) (35). Takata i suradnici su upotrebom sustava dvostrukih hibrida (engl. *two-hybrid system*) pretraživali banku cDNA iz mišje jetre kako bi našli bjelančevine koje međudjeluju s bjelančevinom HRS (engl. *HGF-regulated tyrosine kinase substrate*), za koju se pretpostavljalo da ima ulogu u prijenosu podražaja nizvodno od hepatocitnog čimbenika rasta (HGF, engl. *hepatocyte growth factor*), trombocitnog čimbenika rasta (PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*) i EGF (36). Na taj su način pronašli molekulu koju su nazvali HBP (engl. *HRS binding protein*), te naknadno dokazali da je mišji analog ljudske bjelančevine STAM2. Nasuprot ovim istraživačkim grupama koje su otkrile molekulu STAM2 kao mogućeg sudionika u staničnoj signalizaciji, naša je grupa otkrila gen za STAM2 tražeći gene odgovorne za razvoj živčanog sustava miša postupkom genske zamke (37). Pronađeni gen je nazvan *Lobel*. Nakon objavljivanja slijeda nukleotida gena *Stam2* njegov naziv usklađen je u *Stam2*.

1.2.1. Građa i uloga STAM2

STAM2 je bjelančevina veličine 67 kDa i njegova uloga nije u potpunosti poznata. Premda sa STAM1, pripadnikom iste porodice bjelančevina, dijeli tek 53% sličnosti u pogledu redoslijeda aminokiselina, STAM2 posjeduje iste domene kao STAM1, te se smatra da te dvije bjelančevine imaju sličnu ulogu (36, 38). Obje STAM bjelančevine na svom N-kraju imaju domenu VHS (*Vps-27/Hrs/Stam*; Vps = engl. *vacuolar protein sorting*) koja zajedno sa susjednom domenom UIM (engl. *ubiquitin-interacting motif*; domena koja veže ubikvitin) sudjeluje u vezanju ubikvitina i ubikvitiniranih bjelančevina (slika 3) (39). Slijedi domena SH3 na koju se vežu dvije različite molekule, UBPY (engl. *ubiquitin isopeptidase Y*) i AMSH (engl. *associated molecule*

with the SH3 domain of STAM; molekula povezana s domenom SH3 molekule STAM) (40, 41). Domene „coiled-coil“ i SSM (engl. *STAM-specific motif*) odgovorne su za vezanje bjelančevina STAM za HRS (36, 42). Domena ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; domena odgovorna za aktivaciju imunoreceptorom putem fosforilacije tirozina) se djelomično preklapa s domenom „coiled-coil“, a odgovorna je za vezanje za JAK (33, 35).



Slika 3. Prikaz domena bjelančevine STAM2 (VHS, UIM, SH3, SSM, CC i ITAM) i molekula s kojima se one povezuju. Strelice pokazuju koje molekule se vežu na pojedine domene.

Pretpostavlja se da STAM2 ima ulogu u prenošenju podražaja unutar stanice. Na poticaj različitih citokina i čimbenika rasta, dolazi do fosforilacije tirozina koji se nalaze u STAM2 (35). Pomoću svoje domene ITAM, STAM2 se povezuje s tirozinskim kinazama JAK2 i JAK3, a sudjeluje i u regulaciji unutarstaničnog prijenosa podražaja kojeg stvaraju interleukin-2 i GM-CSF (engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*; čimbenik rasta kolonija granulocita/makrofaga), a koji završava indukcijom gena *c-myc* i sintezom DNA (33, 35). Domena SH3 u bjelančevinama STAM1 i STAM2 upućuje na njihovo moguće djelovanje kao prilagođivača, pa su po tome i dobili naziv, što u hrvatskom prijevodu znači: molekula prilagođivač prijenosa podražaja (engl. *signal transducing adaptor molecule*).

Bjelančevine STAM1 i 2 vežu se za bjelančevinu HRS i time određuju svoj smještaj na ranim endosomima (42, 43). HRS i STAM zajedno s Eps15 (engl. *EGFR pathway substrate clone no. 15*) čine trojni bjelančevinski kompleks (44). Budući da postoji dokaz da HRS sudjeluje u razvrstavanju ubikvitiniranih bjelančevina (receptora) u mikrodomene ranih endosoma obložene klatrinom što sprječava njihovo vraćanje na staničnu površinu, pretpostavlja se da sličnu ulogu ima i molekula STAM (45). Predloženo je da STAM2 sudjeluje i u regulaciji procesa egzocitoze, te u regulaciji otpuštanja presinaptičkih mjehurića (46, 47).

1.3. Proučavanje uloge gena sisavaca

Djelovanje gena pokreće, održava i usmjerava procese koji se odvijaju u organizmu sisavca. Poremećaji gena imaju ključnu ulogu u nastajanju mnogih bolesti i njihovom nasljeđivanju, te se ulažu veliki napor u istraživanje gena i njihovih poremećaja. Dio gena čiji su poremećaji uzrok nekih bolesti u ljudi, je istražen, te je poznata etiopatogeneza tih bolesti. Geni su danas predmet istraživanja ne samo znanstvenika s područja genetike i medicine, već i molekularnih biologa, kemičara, biokemičara, biofizičara i bioinformatičara. Istraživanje gena je složen zadatak koji uključuje pronalaženje novih gena, istraživanje njihove molekularne građe, regulaciju njihova izražaja, način nasljeđivanja i, konačno, njihove uloge u zdravog i bolesnog organizma. Istraživanje gena čiji su poremećaji uključeni u nastajanje bolesti u ljudi i životinja pridonijet će liječenju tih bolesti.

Ovisno o vrsti gena, njegovoj građi, te mjestu i vremenu njegova izražaja, primijenjuju se različiti postupci proučavanja gena. Na primjer gene odgovorne za redovni rad stanica, prikladno je istraživati *in vitro* u kulturi stanica. Geni sa složenom regulacijom izražaja i načinom djelovanja istražuju se *in vivo* u višestaničnom organizmu, u okruženju gdje djeluju. Usporedno s istraživanjem gena *in vitro* i *in vivo*, važno mjesto u njihovom istraživanju ima bioinformatička analiza genske strukture (*in silico*).

1.3.1. Proučavanje uloge gena *in vitro*

Gene čija uloga se želi istražiti *in vitro*, najčešće se potiču na izražaj u kulturi stanica pomoću ekspresijskih vektora. Potom se proučava način djelovanja tako izraženih genskih produkata, bjelančevina. Zahvaljujući posebno izrađenim ekspresijskim vektorima, bjelančevine se mogu proizvesti u većim količinama, izolirati iz kulture stanica i analizirati na biokemijskoj razini. U pokusima *in vitro* moguće je postupcima genetičkog inženjerstva potaknuti gene na pojačani izražaj (engl. *overexpression*), na djelovanje u stanicama gdje inače ne djeluju (engl. *misexpression*), mijenjati građu i regulaciju izražaja gena kako bi se dobio dominantan fenotip. Promjenom slijeda za samo jednu aminokiselinu moguće je utjecati na aktivno mjesto nekog enzima i time promijeniti njegovo djelovanje u stanici. Isto tako, izuzimanjem sljedova odgovornih za nastajanje djelatnih bjelančevinskih domena moguće je istraživati i uloge tih domena u ukupnom djelovanju bjelančevinskog produkta tog gena (36, 39). U kulturi stanica se istovremeno može istraživati više gena, njihova međusobna međudjelovanja, te pripadnost porodicama gena (komplementacijski testovi) (48, 49).

Preinaka gena, a time i njegovog bjelančevinskog produkta često dovodi do promjene fenotipa stanice. Najčešće promjene fenotipa predstavljaju tzv. gubitak uloge (engl. *loss of function*) koji se obično postiže stvaranjem dominantno negativnom verzijom bjelančevine, te tzv. nadodavanje uloge (engl. *gain of function*) koje nastaje kao rezultat poticanja pojačanog izražaja gena pomoću jakog promotora ili ugradnje većeg broja kopija gena u stanicu. Takve promjene fenotipa mogu se proizvesti na razini stanice, kao i na razini tkiva, te cijelog organizma.

U novije vrijeme, osobito nakon dovršetka Projekta ljudskog genoma (engl. *Human Genome Project*) (50, 51), razvija se postupak utišavanja gena pomoću malih intereferirajućih sljedova RNA (siRNAs, engl. *small interfering RNAs*) i kratkih „ukosnica“ RNA (shRNAs, engl. *short hairpin RNAs*) (52). Taj se postupak naziva tehnologija RNAi (engl. *RNA interference*), a njegov je osnovni način djelovanja specifično utišavanje (engl. *knock-down*) genske poruke, a time i sprečavanje stvaranja ciljane bjelančevine. To je djelotvoran postupak koji svojom specifičnošću, jednostavnošću, učinkovitošću i niskim troškovima izvedbe nadilazi sve druge postupke onemogućavanja gena *in vitro*. Očekuje se da će tehnologija RNAi značajno unaprijediti istraživanje molekularnih mehanizama djelovanja gena u normalnim i transformiranim stanicama, a važnu primjenu bi ovaj postupak mogao imati u terapiji raka (52).

1.3.2. Proučavanje uloge gena *in vivo*

Istraživanje gena *in vivo* počiva na analizi promjene fenotipa transgeničnih životinja nosioca preinake u genu koji je predmet proučavanja. Smatra se da preinaka gena izaziva promjenu u djelovanju gena, te da se ta preinaka odražava na fenotip životinje nosioca te preinake. Klasični genetičari istraživali su gene tzv. fenotipskim pristupom gdje je analiza fenotipa spontano ili namjerno promijenjenih gena nepoznate građe dovela do otkrivanja uloge, ali ne nužno i do otkrivanja građe tih gena. Alternativnim, genotipskim pristupom proizvode se preinake u već poznatom genu (53).

1.3.2.1. Miš kao pokusni model u istraživanju uloge gena sisavaca

Najčešće korišten model za istraživanje genetike sisavaca je miš. Miš je mala, za uzgoj razmjerno jeftina životinja koja se brzo razmnožava i prilagođena je životu u laboratorijskim uvjetima. Postojanje visoko srođenih linija omogućuje rad na ujednačenoj genetskoj podlozi (54). Miš dijeli oko 95% gena sa čovjekom. Čovjeku evolucijski bliže životinje poput majmuna su neusporedivo skuplje za uzgoj, te ih je nemoguće osigurati u dovoljnom broju za potrebe temeljnih istraživanja. Zbog duge životne dobi rezultati bi bili neizvjesni (55, 56).

Osim za istraživanja na odraslim životinjama, miš je posebno vrijedan u području embriologije. Dani trudnoće lako se određuju praćenjem čepova u rodnici, a zameci se jednostavno izoliraju na određenim razvojnim stadijima. Analizom vanjskih obilježja zametaka, te uvidom u tablice u kojima su za svaki stadij navedene razvojne osobitosti, može se precizno odrediti točna starost zametka (57). Embrionalni razvoj miša usporediv je s odgovarajućim ljudskim razvojnim stadijima.

1.3.2.2. Ciljana preinaka gena

Postupak kojim se uvodi preinaka u genu unaprijed poznate građe naziva se ciljana preinaka gena (engl. *gene targeting*). Otkriće mišjih embrionalnih matičnih (ES, engl. *embryonic stem*) stanica omogućilo je brz razvoj postupka dobivanja transgeničnih miševa (58). ES stanice su totipotentne stanice izolirane iz embrionalnog čvorića mišje blastociste. ES stanice su nediferencirane i to svojstvo zadržavaju tijekom niza presađivanja u kulturi. Vraćene natrag u mišje zametke na stadiju blastociste ili morule sudjeluju u stvaranju kimeričnih miševa (59). Spolne stanice nastale iz ES stanica omogućuju prijenos genetskog materijala ES stanica na potomstvo kimeričnih miševa (60). Ukoliko je genom ES stanica prethodno u kulturi promijenjen, nova generacija miševa nosit će tu promjenu u svom genomu. Ciljana preinaka gena postiže se homolognom rekombinacijom dijela strane, vektorske DNA i određenog dijela poznatog gena u genomu ES stanica. Tim se postupkom ukloni vitalni dio proučavanog gena, što onemogućava njegovo djelovanje, a miševi s takvom promjenom nazivaju se „knock-out“ miševi (61). Istraživanje fenotipa “knock-out” mutanata primijenjuje se u istraživanju uloge gena u razvoju živčanog sustava (62), razvoju i djelovanju srca (63), te drugim zbivanjima u organizmu sisavaca (64). “Knock-out” miševi vrlo su korisni kao mišji modeli za proučavanje genskih osnova ljudskih bolesti (61).

Posebna vrijednost genetski promijenjenih miševa očituje se u području embriologije. Naime, eksperimentalnu embriologiju zametaka sisavaca otežava razvoj koji se odvija u maternici, te je zametak istraživaču teško dostupan. Budući da su eksperimentalni postupci na zamecima sisavaca time znatno ograničeni, genetski preinačene životinje s različitim razvojnim poremećajima predstavljaju rješenje tog problema. Proučavanje posljedica takvih nedostataka omogućava uvid u etiopatogenezu razvojnih poremećaja.

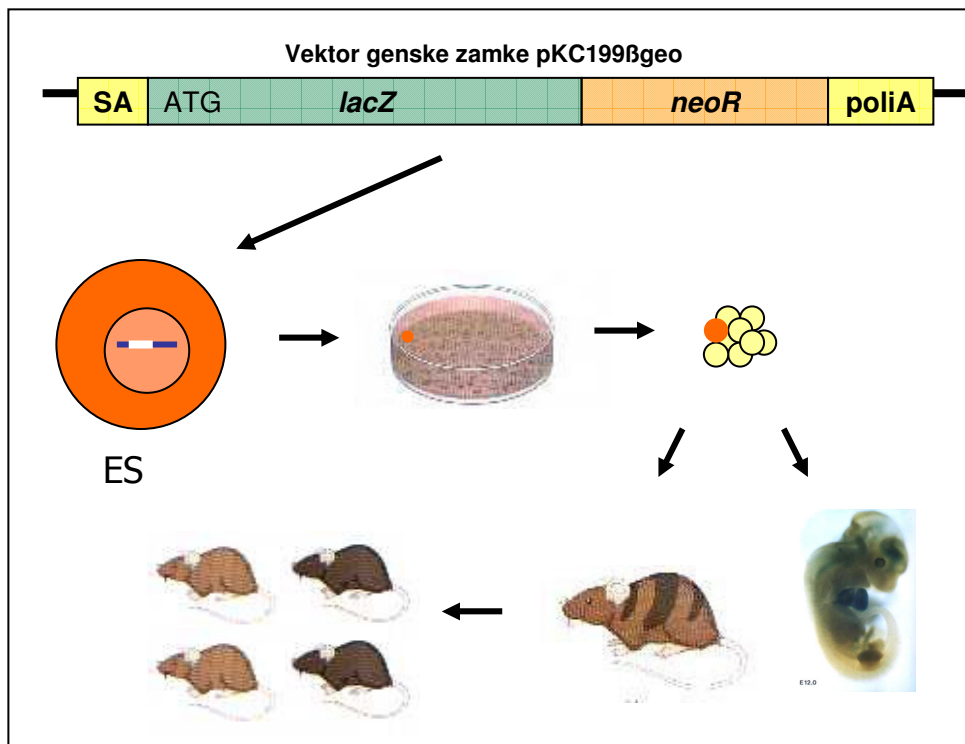
1.3.2.3. Genska zamka

Premda postupak ciljane preinake gena ima prednosti, njegova je primjena ograničena na gene čija je građa unaprijed poznata. Postupak koji je sličan postupku ciljane preinake gena, a ne traži prethodno poznavanje građe gena, je postupak genske zamke (engl. *gene trap*). Taj postupak istovremeno omogućuje pronalaženje novih gena, njihovu jednostavnu identifikaciju, te stvaranje transgeničnih miševa s preinakom u tim genima (65 - 68). Dodatna prednost tog postupka je mogućnost praćenja uzorka izražaja preinačenih gena tijekom embrionalnog razvoja kao i u odraslog miša (zbog čega je pogodan za proučavanje gena uključenih u embrionalni razvoj sisavaca) (69).

Za razliku od ciljane preinake gena, gdje se vektorska DNA ugrađuje u genom embrionalnih matičnih stanica homolognom rekombinacijom na unaprijed određeno mjesto, kod genske zamke se vektorska DNA ugrađuje u genom nasumično. Mjesto ugradnje vektora nije unaprijed poznato, pa se on može ugraditi i u novi, nepoznati gen.

Vektor genske zamke sadrži gen biljeg *lacZ*, koji odražava aktivnost gena uhvaćenog u gensku zamku, zatim gen izbornik *neoR* koji omogućuje odabir klonova embrionalnih matičnih stanica s ugrađenim vektorom (65, 67). Oba gena su zbog nedostatka vlastitog promotora pod utjecajem promotora gena u koji je vektor ugrađen, što znači da su aktivni kada je aktivan i uhvaćeni gen. Pored toga, ugrađeni DNA vektor onemogućuje normalnu aktivnost uhvaćenog gena i time pruža mogućnost za proučavanje fenotipa i uloge uhvaćenog gena (70).

Vektor genske zamke ubacuje se u mišje embrionalne matične stanice retroviralnom infekcijom ili elektroporacijom. Promijenjene embrionalne matične stanice s ugrađenim vektorom genske zamke odabiru se uzgojem na podlozi s neomicinom, te se vraćaju u mišje blastociste/morule. Iz takvih kimeričnih blastocista ili morula nastaju kimerični zameci, čije stanice potekle od ES stanica nose gensku preinaku (slika 4). Oni se mogu upotrijebiti za analizu uzorka izražaja gena uhvaćenog genskom zamkom praćenjem aktivnosti gena *lacZ*. Analiza uzorka izražaja u kimeričnim zamecima jedan je od ključnih koraka u odabiru gena za daljnje istraživanje. Pored toga tim se postupkom dobivaju podaci o ulozi gena, što pridonosi pravilnom usmjeravanju daljnjeg istraživanja.



Slika 4. Dobivanje transgeničnih miševa postupkom genske zamke. Vektor genske zamke ugradi se u embrionalne matične stanice (ES). Promijenjene ES se odabiru na podlozi s neomicinom, te se ugrađuju u nepromijenjenu morulu ili blastocistu. Nastaju kimerični zameci koji služe za odabir promijenjenih gena na temelju aktivnosti β -galaktozidaze, proizvoda gena *lacZ* iz vektora genske zamke. Dio potomaka kimeričnih miševa heterozigotni su nosioci preinake nastale ugradnjom vektora genske zamke. **SA** – primač prekrajanja (engl. splice acceptor), **ATG** – start kodon (inicijator transkripcije), ***lacZ*** – gen biljeg, ***neoR*** – gen izbornik, ***poliA*** – signal za poliadenilaciju mRNA

Iz ES stanica s promjenom u odabranim genima dobivaju se mišje linije koje su nosioci odgovarajuće preinake. Međusobnim križanjem heterozigotnih nosioca preinake dobivaju se homozigoti koji imaju ugrađeni vektor genske zamke u oba alela. Takvi transgenični homozigotni miševi se upotrebljavaju za analizu promjene fenotipa nastale preinakom u uhvaćenom genu.

Postupkom genske zamke uspješno se istražuju geni uključeni u procese embrionalnog razvoja sisavaca, što omogućuje praćenje uzorka izražaja promijenjenog gena kroz sve stadije embrionalnog razvitka (67, 71, 72).

1.4. Transgenična mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj}

Na Max Planck institutu za biofizičku kemiju u Göttingenu dobivena je postupkom genske zamke transgenična mišja linija s preinakom u genu *Stam2* s ciljem da se istraži uloga gena važnih za embrionalni razvoj živčanog sustava (37, 70). Pri tom je upotrijebljen vektor genske zamke pKC199βgeo (72) koji na svom 5' kraju sadrži primač prekrajanja iz mišjeg gena *Hoxc9*, potom slijedi gen *βgeo* bez vlastitog promotora, koji se sastoji od gena za enzim β-galaktozidazu *lacZ* te gena za enzim neomicin fofsotransferazu *neoR* koji stanicama domaćinima osigurava otpornost na neomicin. Na svom 3' kraju vektor sadrži poliadenilacijsko mjesto koje uzrokuje stvaranje transkripta endogenog gena bez dijela koji se nalazi nizvodno od mjesta ugradnje vektora genske zamke, što uzrokuje djelomično ili potpuno onemogućavanje tog gena. Vektor je ugrađen u mišje ES stanice postupkom elektroporacije. Iz preinačenih ES stanica nastali su kimerični zameci, koji su poslužili za odabir gena za daljnje istraživanje na temelju uzorka izražaja tih gena na razvojnem stadiju E11,5. Izražaj tih gena određen je histokemijskim prikazivanjem aktivnosti β-galaktozidaze koja je potaknuta promotorom gena u kojem je ugrađen vektor genske zamke, te je tako odražavala aktivnost promijenjenog gena. Gen čiji je izražaj bio ograničen na područje neuralne cijevi i srca odabran je za daljnje istraživanje. U daljnjem postupku načinjen je transgenični miš s promjenom u tom genu. Postupcima 5' i 3' RACE (engl. *Rapid amplification of cDNA ends*) otkriven je redosljed nukleotida tog gena, te je usporedbom s genski bazama podataka ustanovljeno da se radi o genu *Stam2* (Genbank NM 019667) (37). Stoga se mišja linija s promjenom u genu *Stam2* nastalom postupkom genske zamke naziva *Stam2*^{Gt1Gaj}. Gt znači da je linija dobivena genskom zamkom (engl. *gene trap*), 1 je oznaka za prvu (i jedinu) preinaku genskom zamkom gena *Stam2* koja je napravljena, a Gaj je ILAR (engl. *International Laboratory Register*, http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/) kod za Laboratorij za neurogenetiku i razvojnu biologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji se dodjeljuje prema prezimenu glavnog istraživača (Gajović) (73). Križanjem heterozigotnih nosilaca te preinake s miševima soja C57Bl/6NCrl dobivena je kroz 20 generacija transgenična mišja linija s genetičkom podlogom identičnom s miševima soja C57Bl/6NCrl s jedinom razlikom u genu *Stam2* koji je kod transgeničnih miševa promijenjen. Stoga se linija *Stam2*^{Gt1Gaj} može smatrati kongeničnom u odnosu na miševe soja C57Bl/6NCrl.

1.4.1. Istraživanje uloge gena *Stam2*

Dosadašnja istraživanja kojima je cilj bio otkriti način djelovanja i ulogu gena *Stam2* provedena su na pokusima u kulturi stanica (35, 36, 39, 42, 46, 74). Rezultati tih pokusa dali su mnogo podataka o građi bjelančevine STAM2, djelovanju pojedinih njenih domena, njenom unutarstaničnom smještaju te međudjelovanju s drugim bjelančevinama u stanici. Ti podaci, te teoretska usporedba s drugim molekulama i bjelančevinskim domenama, ukazali su na ulogu gena *Stam2* unutar stanice kao i na ulogu u organizmu sisavca.

Daljnja istraživanja gena *Stam2* nužno uključuju eksperimente *in vivo*, na modelu miša. U ovom radu je za istraživanje izražaja gena *Stam2* odabrana mišja linija *Stam2^{Gt1Gaj}* upravo zbog prisutnosti gena biljega *lacZ* u preinačenom genu *Stam2* koji omogućuje jednostavno praćenje njegovog izražaja histokemijskim bojanjem na β -galaktozidazu. Pored toga, ova se mišja linija može upotrijebiti i za proučavanje promjene fenotipa tih životinja obzirom da ugrađeni vektor genske zamke pKC199 β geonemogućuje proizvodnju normalne bjelančevine STAM2, a time i njegovo djelovanje.

2. HIPOTEZA I CILJ RADA

2.1. Hipoteza

Izražaj gena *Stam2* prisutan je u embrionalnom razvoju miša tijekom organogeneze, u područjima međustanične komunikacije regulirane endocitozom, te diferencijacije stanica kao odraz ovog međudjelovanja. Područja izražaja uključuju prvenstveno razvoj živčanog sustava i to neuralne cijevi i kore velikog mozga. Osim u živčanom sustavu, *Stam2* je izražen tijekom razvoja srca.

2.2. Cilj rada

2.2.1. Opći ciljevi

Opći cilj rada je odrediti izražaj *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja i u odraslog miša.

2.2.2. Specifični ciljevi

Opći cilj uključuje ostvarivanje posebnih ciljeva:

1. pokazati da je mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} odgovarajući model za određivanje izražaja gena *Stam2*
2. odrediti prisutnost mRNA, te bjelančevine STAM2 u organima odraslih miševa postupcima RT-PCR i western blot,
3. odrediti izražaj *Stam2* u mišjim zamecima na nizu razvojnih stadija postupkom histokemijskog bojanja na enzim β -galaktozidazu,
4. odrediti izražaj *Stam2* u mozgu novorođenih i odraslih miševa postupkom histokemijskog bojanja na enzim β -galaktozidazu,
5. povezati izražaj s mogućom ulogom *Stam2*.

3. UZORCI I POSTUPCI

3.1. Pokusne životinje

U ovom radu upotrijebljeni su mišji zameci i odrasli miševi soja C57Bl/6NCrl, te transgenične linije *Stam2*^{Gt1Gaj} s genskom zamkom preinačenim genom *Stam2* koja je kongenična liniji C57Bl/6NCrl. Ukupno je za pokuse upotrijebljeno 27 odraslih ženki, 30 odraslih mužjaka i 24 legla zametaka, od čega je žrtvovano 25 ženki, 18 mužjaka i 24 legla zametaka. 12 mužjaka je nakon parenja vraćeno u nastambu, kao i dvije ženke čiji su novorođeni potomci prethodno žrtvovani i upotrijebljeni za pokuse.

3.2. Postupci sa životinjama

3.2.1. Parenje životinja

24 ženki soja C57Bl/6NCrl spareno je s 12 mužjaka heterozigotnih nosilaca preinake u *Stam2* u svrhu dobivanja 24 legla (po dva za svaki stadij razvitka) zametaka za histokemijsko određivanje aktivnosti β -galaktozidaze. Svako jutro provjerena je rodnicu sparenih ženki kako bi se utvrdila prisutnost čepa u rodnici, odnosno početak trudnoće.

3.2.2. Žrtvovanje životinja

Životinje predviđene za izolaciju zametaka i za izolaciju DNA, RNA i bjelančevina iz pojedinih organa žrtvovane su postupkom cervikalne dislokacije, koja kod životinja izaziva trenutnu smrt i minimalnu bol. Naglim pokretom povlačenja repa uz istovremeno držanje glave životinje u nepomičnom položaju i lagano pritiskanje vrata životinje uz podlogu oštećena je kralježnica i kralježnična moždina u području vrata.

Životinje predviđene za fiksaciju perfuzijom (tijekom izolacije mozga namijenjenog za histokemijsko određivanje aktivnosti β -galaktozidaze) prije zahvata su uspavane injiciranjem odgovarajuće doze Avertina u peritonealnu šupljinu. Tijekom postupka dolazi do bezbolne smrti životinja.

3.2.3. Izolacija zametaka

U određene dane trudne mišice su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Otvorena im je trbušna šupljina, izvađeni rogovi maternice sa zamecima i premješteni u fosfatni pufer PBS (engl. *phosphate buffered saline*; 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na₂HPO₄, 0,14 mM KH₂PO₄), gdje su zameci odvojeni od svojih ovojnica.

3.2.4. Određivanje starosti zametaka

U ovom radu starost zametaka određivala se brojem dana nakon oplodnje. Kao znak oplodnje uzet je nalaz čepa u rodnici jutro nakon parenja. Taj dan je određen kao 0,5 dana starosti zametka. Promatranjem vanjskih osobina zametka i brojem somita potvrđeno je da je zamek na odgovarajućem razvojnem stadiju. Starost zametka izražena u danima uspoređena je s razvojnim stadijima po Theileru (75). Izražaj gena *Stam2* određen je na nizu razvojnih stadija od zametaka starih 7,5 dana do novorođenih miševa, s razmakom od 1 dan između stadija.

3.2.5. Genotipizacija

Genotip miševa linije *Stam2*^{Gt1Gaj} određivan je postupkom lančane reakcije polimerazom s uzorcima DNA izoliranim iz repa odraslih miševa, te početnicama specifičnim za alel *Stam2* s ugrađenim vektorom genske zamke (početnice LOB5A i lac2) i netaknuti alel *Stam2* (početnice LOB5A i LOB31) (tablica 2). Na taj način bilo je moguće razlučiti genotipove miševa divljeg tipa, te heterozigotnih i homozigotnih nosioca preinake u genu *Stam2* nastale genskom zamkom.

Genotip mišjih zametaka upotrijebljenih za analizu izražaja gena *Stam2* histokemijskim bojanjem na β-galaktozidazu određivan je na osnovu reakcije na histokemijsko bojanje. Obzirom da su se analizirali potomci heterozigotnog roditelja i roditelja divljeg tipa, otprilike 50% zametaka iz jednog legla pokazivalo je promjenu boje supstrata za β-galaktozidazu u plavo. Po potrebi se genotip zametaka određivao već opisanim postupkom lančane reakcije polimerazom s uzorcima DNA izoliranim iz fetalnog dijela posteljice.

3.3. Histokemijsko određivanje aktivnosti β-galaktozidaze

Postupak histokemijskog određivanja aktivnosti β-galaktozidaze sastojao se od izolacije organa ili zametka, fiksacije, rezanja, ispiranja puferom, inkubacije sa supstratom, ponovnog ispiranja

puferom, te prosvjetljivanja glicerolom. Način pohranjivanja obrađenih uzoraka ovisio je o primijenjenom postupku rezanja. Uzorci rezani vibratomom montirani su na predmetno stakalce, dok su se cjeloviti ili skalpelom rezani organi i zameci pohranjivali u 70% otopini glicerola u puferu.

3.3.1. Fiksacija i rezanje tkiva

Tkiva namijenjena za određivanje β -galaktozidazne aktivnosti fiksirana su u fiksativu sastavljenom od 2% formaldehida i 0,2% glutaraldehida u fosfatnom puferu PBS i ohlađenom na temperaturu oko +4°C. Zameci su uronjeni u fiksativ odmah po izolaciji iz maternice, dok je mozak fiksiran postupkom perfuzije, te potom uranjanjem (imerzijom) u fiksativ. Trajanje fiksacije ovisilo je o veličini uzorka, tako da su mlađi zameci fiksirani pola do jedan sat, a stariji zameci i rezovi mozga odraslih miševa jedan sat. Uzorci tkiva nakon fiksacije ispirali su se fosfatnim puferom PBS na temperaturi +4°C, 3 – 4 puta tijekom naredna tri sata.

Tijekom fiksacije zameci E13,5 – E18,5 su rezani skalpelom sagitalno ili poprečno na pola, a mozgovi zametaka E16,5 – E18,5 i novorođenih miševa na rezove debljine 1 -2 mm. Mозгови odraslih miševa (3 mužjaka heterozigota i 3 mužjaka divljeg tipa) rezani su vibratomom na horizontalne i frontalne rezove debljine 300 μ m. Tijekom rezanja uzorci su privremeno uronjeni u fosfatni pufer, a nakon toga su vraćeni u fiksativ.

3.3.2. Inkubacija sa supstratom X-gal

Postupak inkubacije sa supstratom za β -galaktozidazu, X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid), jednako je primijenjen na sve uzorke neovisno o njihovoj veličini i načinu rezanja. Uzorci su inkubirani u otopini boje (0,5 mg/ml X-gal, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM $K_4Fe(CN)_6$, 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ u puferu PBS) u koju su za veće uzorke dodani deterdženti Igepal (Sigma, 0,01%) i natrij deoksikolat (0,01%), jedan do dva dana na temperaturi 37°C.

Nakon inkubacije u otopini boje, uzorci su se ispirali u puferu PBS. Ako je otopina boje sadržavala deterdžente, oni su u istoj koncentraciji stavljeni u pufer za ispiranje. Posljednje ispiranje bilo je s puferom bez deterdženata.

3.3.3. Pohranjivanje obrađenih uzoraka

Uzorci rezani ručno skalpelom kao i cijeli zameci su nakon ispiranja od otopine boje vođeni kroz uzlazni koncentracijski niz glicerola (20%, 50% i 70% glicerol u puferu PBS). Na taj je način tkivo prosvijetljeno, a istovremeno i sačuvano od mikroorganizama. Uzorci su pohranjeni u 70% glicerolu gdje se mogu čuvati nekoliko godina. Manji komadići tkiva su za potrebe fotografiranja zajedno s glicerolom stavljeni na predmetno stakalce i poklopljeni pokrovnim stakalcem. Da ne bi došlo do gnječenja uzoraka, a time i do njihovog iskrivljavanja, pokrovna su stakalca sa strane poduprta izlomljenim pokrovnim stakalcima.

Uzorci rezani vibratomom su nakon ispiranja puferom PBS kratko isprani u demineraliziranoj vodi, montirani na predmetno stakalce, te pokriveni sredstvom za pokrivanje vodenih preparata Aquatex (Merck) i poklopljeni pokrovnim stakalcem. Nakon sušenja na zraku, ovi preparati ostaju očuvani godinama.

Fotografije pripremljenih uzoraka učinjene su digitalnom kamerom Nikon DXM1200 uz pomoć mikroskopa Olympus AX70 i lupe Olympus SZH10.

3.4. Postupci s DNA

3.4.1. Izolacija DNA

U svrhu genotipizacije miševa linije *Stam2^{Gt1Gaj}* DNA je izolirana iz mišjeg repa. Neposredno nakon biopsije, tkivo vrha repa (0,5 – 1 cm) stavljeno je zajedno s 500 µl pufera za razgradnju tkiva (engl. *lysis buffer*; 100 mM Tris·Cl, pH8,0 (Tris = trishidroksimetilaminometan), 5 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), 0,2% SDS (natrijdodecilsulfat), 200 mM NaCl, 100 µg/ml proteinaze K). Tkivo je ostavljeno u puferu 12 – 20 sati na 56°C i zatim centrifugirano 20 minuta na najvećoj brzini (14000 g; Eppendorf Centrifuge 5415C). U odvojeni nadtalog stavljena je ista količina (500 µl) izopropanola. Pažljivim okretanjem epruveta za mikrocentrifugiranje poklopcem prema dolje pomiješani su uzorak i izopropanol. Ovim su postupkom vlakna DNA povezana u tanku mrežicu vidljivu unutar otopine koja je potom istaložena centrifugiranjem na 14000 g 5 minuta. Nakon odstranjivanja nadtaloga, DNA je isprana s 1 ml 70% etanola, te ponovno centrifugirana 5 minuta na 14000 g. Postupak ispiranja je

ponovljen 2 puta. Nakon nekoliko sati sušenja DNA na zraku u otvorenim epruvetama za mikrocentrifugiranje, DNA je otopljena u 50 μ l destilirane vode (dH₂O).

Velika količina visokokvalitetne DNA namijenjene za izvođenje postupka Southern hibridizacije izolirana je iz organa odraslih miševa. Životinja je žrtvovana cervikalnom dislokacijom, izdvojen je oko 1 g tkiva i odmah smrznut u tekućem dušiku, te usitnjen u rashlađenom tarioniku i stavljen u 10ml pufera za otapanje (10 mM Tris·Cl, pH 8.0, 0,1 M EDTA, pH 8.0, 20 μ g/ml RNaseI (Boehringer Mannheim), 0.5% SDS). Tkivo se otapalo 1 sat na 37°C u hibridizacijskoj pećnici s ugrađenom tresilicom. Nakon toga, u otopljeno tkivo dodan je 1 mg proteinaze K (konačna koncentracija proteinaze K bila je 100 μ g/ml). Sve se zajedno grijalo uz laganu trešnju preko 3 sata na 50°C, te je centrifugirano 20 minuta na najvećoj brzini (14000 g). Nadtalog je pročišćen tri puta istom količinom fenola (~10 ml), zatim jednom fenol:kloroformom (1:1) i jednom čistim kloroformom. Iz uzorka je istaložena DNA pomoću 1/10 volumena natrij acetata, pH 5,2 (1 ml) i 2,5 volumena 100% etanola (25 ml). Taloženje se odvijalo na temperaturi –20°C tijekom 20 minuta ili duže. Nakon centrifugiranja 5 minuta najvećom brzinom, talog je dva puta ispran 70% etanolom, osušen na zraku i otopljen u destiliranoj vodi.

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određivana je pomoću spektrofotometrijskog uređaja UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER (Camspec). Mjerena je apsorbancija UV zraka pri valnim duljinama 260 nm (A_{260} , maksimalna apsorpcija nukleinskih kiselina) i 280 nm (A_{280} , maksimalna apsorpcija bjelančevina). Iz izmjerene apsorbancije pri 260 nm dobivena je koncentracija DNA, dok je čistoća DNA u uzorku određena iz omjera A_{260}/A_{280} . Za DNA zadovoljavajuće čistoće taj omjer iznosi između 1,6 i 1,8.

3.4.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom izvedena je tijekom izrade rada mnogo puta pri različitim uvjetima. Mijenjao se izbor početnica i temperatura njihovog lijepljenja na kalup DNA.

Sastojci reakcijske smjese po jednoj reakciji (50 μ l) prikazani su u tablici 1.

Tablica 1.

Sastojak	Početna koncentracija	Dodana količina u 50 μ l smjese	Konačna koncentracija
smjesa nukleotida	25 mM	0,4 μ l	200 μ M
početnica I	10 pmol/ μ l	1,0 μ l	200 nM
početnica II	10 pmol/ μ l	1,0 μ l	200 nM
uzorak DNA		1,0 μ l	
pufer za DNA polimerazu	10x	5,0 μ l	1x
MgCl ₂	25 mM	4,0 μ l	2 mM
Taq DNA polimeraza	5jedinica/ μ l	0,3 μ l	1-2 jedinice
d H ₂ O		ad 50 μ l	

U svim pokusima upotrebljena je Taq DNA Polimerase (Promega), osim u slučajevima kada je trebalo umnožiti odsječke DNA namijenjene kloniranju i sekvencioniranju, kada je upotrebljena Taq DNA Polimerase drugog proizvođača (Boehringer Mannheim). Smjesa nukleotida napravljena je miješanjem pojedinačnih nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; Promega) u istom omjeru.

Tablica 2. Početnice upotrebljene u lančanim reakcijama polimeraze

Početnica	Redoslijed nukleotida (5' → 3')	Početnica	Redoslijed nukleotida (5' → 3')
14A3	GCCAGAGCGTCGGGATTCAG	LOB3P	CAAGCCGTCTAGGAAGCCGC
14A5	GAGTGCTTCCAACCCTGTCA	LOB51	ATAAAGCTCTGACTCTCCG
14B3	TGACAGGGTTGGAAGCACTC	LOB5A	TTATGGCTTTTAGGCAATCT
A1	GCCAGAGCGTCGGGATTCAG	LOB5B	GCTCCAAGAAGGGTCAATGC
A2	GAGTGCTTCCAACCCTGTCA	LOB5C	CTGCGGAAGGAAAAGTAACC
A3	GAAAAGCGCTCTCCCACTCT	LOB5F	CAGTTGGCGTCACTGTCATC
GC105	TTGGCGTAAGTGAAGCGAC	LOB5G	TAAACAGCACACCCACAAAG
GC106	AGCGGCTGATGTTGAAGT	LOBA3	CGTGATGCCTCTGTTCACTG
Lac2	CTGCAAGGCGATTAAGTTGG	REV	GGAAACAGCTATGACCATG
LOB31	GCTTTACAGTGGGATACAT	UNI	GTAATACGACTCACTATAGGC

Tijekom cijelog postupka pripreme lančane reakcije polimerazom uzorci su stajali na ledu. Reakcija se odvijala u stroju za lančanu reakciju polimerazom (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) na sljedeći način:

1. denaturacija uzoraka dvije minute na 95°C
 2. 10 sekundi denaturacije na 95°C
 3. 30 sekundi lijepljenja početnica na temperaturi odabranoj za svaku reakciju posebno
 4. 90 sekundi produžavanja lanca na 72°C
 5. 7 minuta završne polimerizacije svih nedovršenih lanaca DNA na 72°C
- 30x {

Odmah nakon završetka reakcije temperatura uzoraka bila je spuštena na 4°C. Rezultati lančane reakcije polimerazom provjereni su elektroforezom u gelu agaroze.

3.4.3. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Reakcijska smjesa za cijepanje plazmidne i genomske DNA, sadržavala je 0,1 mg/ml BSA (engl. *bovine serum albumine*; acetilirani albumin iz goveđeg seruma), 1x koncentrirani reakcijski pufer za restrikciju (Promega), 5-10 jedinica restrikcijskog enzima (Promega) po mikrogramu DNA, te DNA. Količina plazmidne DNA upotrebljena u svim reakcijama bila je 0,2 – 1,0 µg, a količina genomske DNA cijepane za potrebe hibridizacije bila je 10-30 µg. Reakcija cijepanja DNA restrikcijskim enzimima odvijala se na 37°C. Trajala je 2-3 sata za plazmidnu DNA, odnosno 12-20 sati za genomsku DNA.

3.4.4. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu

Postupak elektroforeze na agaroznom gelu primijenjen je za prikazivanje rezultata lančane reakcije polimerazom, za provjeru dužine fragmenata DNA nastalih cijepanjem plazmida restrikcijskim enzimima i za razdvajanje ukupne genomske DNA porezane restrikcijskim enzimima prije prijenosa na membranu za hibridizaciju.

Postotak agaroze u agaroznom gela ovisio je duljini molekula DNA koje je trebalo prikazati. Za kraće odsječke napravljen je gušći agarozni gel (1,5%), a za dulje fragmente rijedi gel (0,8%).

Za pripravu gela za elektroforezu agarosa je stavljena u Erlenmayerovu tikvicu zajedno s puferom za elektroforezu (89 mM Tris-Cl, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8.0). Agarosa je otopljena u puferu zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici oko jedne minute i ohlađena na 50°C. Za vrijeme hlađenja dodano je 4,5 µl otopine etidij bromida (10 mg/ml) na 100 ml gela. Otopljena agarosa polimerizirala se u kadici za elektroforezu 15 minuta u koju je bio utaknut češalj za oblikovanje jažica. Na gotovi agarozni gel stavljen je pufer za elektroforezu.

Uzorci DNA su stavljani u jažice na agaroznom gelu tako da su prethodno pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka (30% glicerol, 0,25% bromfenol plavilo, 0,25% ksilen cijanol).

Elektroforeza se obično odvijala pod naponom 10-15 mV/cm gela, osim kada je elektroforezom trebalo razvući pocijepanu genomsku DNA za potrebe hibridizacije DNA. Tada je napon bio 1-2 mV/cm gela, a elektroforeza je trajala 16 sati.

3.4.5. Sekvencioniranje

0,3 – 0,5 µg plazmidne DNA s ugrađenim odsječkom nepoznatog redoslijeda nukleotida stavljeno je zajedno s 3,2 pmola DNA početnice i 8 µl kompleta za sekvencioniranje (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction With AmpliTaqR DNA Polymerase, FS; Perkin-Elmer) u reakcijsku smjesu ukupnog volumena 20 µl. Početnice upotrebljene za ovu reakciju bile su UNI ili REV (tablica 2).

U pripremljenoj reakcijskoj smjesi odsječci DNA su umnoženi postupkom lančane reakcije polimerazom u 25 krugova. Svaki krug se sastojao od 10 sekundi denaturacije na 96°C, 5 sekundi ljepljenja početnica na 50°C i 4 minute produžavanja lanca DNA na 60°C. Reakcija je završila hlađenjem uzoraka na 4°C.

Nakon završetka lančane reakcije polimerazom, reakcijska je smjesa pročišćena od obojenih dideoksinukleotida tako da je stavljena u smjesu od 2 µl 3M natrij acetata, pH 4.6 i 50 µl 95% etanola. Sve zajedno je promiješano na vorteksu i ostavljeno na ledu najmanje 10 minuta. Istaložena DNA bez nukleotida je nakon centrifugiranja (14000 g, 15-30 minuta) isprana u 250 µl 70%-tnog etanola i osušena na zraku.

Osušeni talog DNA je otopljen u 3 µl pufera za nanošenje uzoraka na gel (EDTA/Blue dextran: smjesa formamida i 25 mM EDTA/Blue dextrana u omjeru 5:1), sve zajedno denaturirano 2 minute na 90°C i spremljeno na led do trenutka nanošenja po 1,5 µl uzorka na 5%-tni akrilamidni gel (akrilamid:bisakrilamid=19:1, BioRad).

Akrilamidni gel s nanijetim uzorcima postavljen je u uređaj za sekvencioniranje ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) i stavljen pod napon 44 V/cm (1680 V/38 cm gela) uz protok struje od 50 mA kroz 7 sati. Uređaj za sekvencioniranje laserskim je čitačem očitao redoslijed nukleotida.

3.4.6. Hibridizacija DNA (Southern blot)

3.4.6.1. Označavanje DNA probe za hibridizaciju

DNA probe za hibridizaciju su označene digoksineninom. Vizualizacija probe temeljila se na enzimskoj reakciji alkalne fosfataze, prisutne na protutijelu na digoksinenin sa supstratom za alkalnu fosfatazu “CDP Star” (Boehringer Mannheim). Supstrat “CDP Star” svjetli u reakciji s alkalnom fosfatazom. Ta se pojava zove kemiluminiscencija.

DNA probe su označene postupkom lančane reakcije polimerazom. Osim uobičajenih sastojaka u reakcijsku smjesu je dodan i DIG-dUTP (Boehringer Mannheim), nukleotid označen digoksigeninom. Početnice i temperatura ljepljenja početnica odabrani su ovisno o DNA probi koja se označavala. Kalup za sintezu DNA bio je željeni odsječak DNA ukloniran u plazmid.

Prije stavljanja DNA probe u hibridizacijsku otopinu, DNA proba je denaturirana 10 minuta na 95°C i naglo ohlađena na ledu.

3.4.6.2. Priprema membrane i hibridizacija

Agarozni gel s genomskom DNA je poslije elektroforeze denaturiran 2 puta po 15 minuta u puferu za denaturaciju (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl), ispran u destiliranoj vodi, te dva puta po 15 minuta neutraliziran u puferu za neutralizaciju (3M NaCl, 0.5 M Tris Cl, pH 7.5) tako da pH gela nije viši od pH 9.0. Tako pripremljeni gel postavljen je u stupac za prijenos na membranu kapilarnim putem. Ispod gela postavljen je veći komad filter papira 3MM (Whatman) namočen u kadici u 10x koncentriranom puferu SSC (10 x SSC; 1,5 M NaCl, 0,15 M natrij citrat, pH 7.0). Na gel je stavljena najlonska membrana za hibridizaciju (Boehringer Mannheim) prethodno namočena u 10 x SSC. Na membranu je postavljen stupac upijajućih papira i uteg od 500g. Kapilarni prijenos se odvijao preko noći na sobnoj temperaturi. Kad je prijenos bio gotov, DNA je učvršćena na membranu izlaganjem UV svjetlu tri minute na UV transiluminatoru ili u uređaju za križno povezivanje (engl. *crosslinker*, UV Stratalinker 1800, Stratagene). Nakon toga membrana je isprana u destiliranoj vodi i osušena na filter papiru.

Osušena membrana je prije hibridizacije stavljena najmanje 1 sat u otopinu za prehibridizaciju (5 x SSC, 1% (w/v) Blocking Reagent (Boehringer Mannheim), 0.1% N-lauroilsarkozil, 0.02% SDS), u hibridizacijskoj pećnici na temperaturi od 60°C. Nakon toga otopina za prehibridizaciju zamijenjena je otopinom za hibridizaciju (otopina za prehibridizaciju s 1 pmol/ml označene DNA probe) i ostavljena preko noći na 60°C u hibridizacijskoj pećnici. Drugi dan je membrana isprana dva puta po 5 minuta u otopini za ispiranje 2x (2 x SSC, 0,1% SDS) na sobnoj temperaturi i dva puta po 15 minuta u otopini za ispiranje 0,5x (0,5 x SSC, 0.1% SDS) na 60°C.

Membrana s hibridiziranom probom isprana je 5 minuta na sobnoj temperaturi u puferu za ispiranje (0.1 M malatna kiselina, 0.15 M NaCl, 0.3% (v/v) Tween 20, pH 7.5), zatim 1 sat u puferu II (0.1 M malatna kiselina, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 1% Blocking Reagent), te 30 minuta u otopini protutijela (pufer II, Anti-DIG-AP Conjugate 1:20000, Boehringer Mannheim). Višak antitijela ispran je tri puta po 10 minuta čistim puferom za ispiranje. Prije stavljanja "CDP Star"-

a, supstrata za kemiluminiscenciju (Boehringer Mannheim), membrana je umočena nekoliko minuta u pufer III (0.1 M Tris Cl, 0.1 M NaCl, pH 9.5). U 1 ml čistog pufera III stavljeno je 10 μ l “CDP Star”-a i pipetom nanijeto na membranu (otprilike 0,5 ml na 100 cm² membrane). Supstrat je stajao na membrani 5 minuta, nakon čega je membrana djelomično osušena na filter papiru i zamotana u plastičnu foliju. Membrana u foliji je stavljena u kutiju s filmom (BioMax Light, Kodak). Vremena ekspozicije su bila 1', 5', 15' i 45' ili preko noći.

3.5. Postupci s RNA

3.5.1. Izolacija RNA iz organa odraslog miša

Tkivo odraslog miša mase 50-100 mg je odmah nakon izolacije smrznuto u tekućem dušiku, prebačeno u 10x veći volumen (1ml) TRI-Reagenta (Molecular Research Center) i homogenizirano. Homogenizirano tkivo stajalo je u TRI-Reagentu na ledu 5-15 minuta, a zatim mu je dodano 0,2 ml kloroforma uz jako miješanje na vorteksu. Nakon nekoliko minuta stajanja na ledu uzorak je centrifugiran 15 minuta na 12000 g na +4°C. Vodena (gornja) faza prebačena je u čistu mikroeprijetu, dodano joj je 0,5 ml izopropanola, sve zajedno je lagano promiješano i ostavljeno na -70°C najmanje pola sata. Sljedilo je centrifugiranje 15 minuta na +4°C i 12000 g. Stvoreni talog je ispran sa 75% etanolom, ponovo centrifugiran 5 minuta na +4°C i 7500 g. Etanol je odstranjen, talog je ostavljen 10 minuta na ledu da se suši, pa otopljen u 50-100 μ l vode. Nakon grijanja 10 minuta na 55-60°C, otopljena RNA spremljena je na -70°C.

Koncentracija i čistoća izolirane RNA određivana je pomoću spektrofotometrijskog uređaja UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER (Camspec). Mjerena je apsorbancija UV zraka pri valnim duljinama 260 nm (A_{260} , maksimalna apsorpcija nukleinskih kiselina) i 280 nm (A_{280} , maksimalna apsorpcija bjelancevina). Koncentracija RNA u uzorku određena je na temelju vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini 260 nm, a njena je čistoća određena iz omjera A_{260}/A_{280} . Za RNA zadovoljavajuće čistoće taj omjer iznosi između 1,8 i 2,0.

3.5.2. Elektroforeza RNA na formaldehidnom gelu

Formaldehidni gel pripremljen je tako da je 0,54 g agaroze (Promega) otopljeno u 30,5 ml sterilne vode grijanjem u mikrovalnoj pećnici. Kad se agarozna ohladila na približno 60°C dodana joj je smjesa od 3,6 ml 10x otopine MOPS-a (0,2 M MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonska

kiselina), 0,05 M natrij acetat, 0,01 M EDTA, pH 7.0) i 2 ml formaldehida, sve zajedno je dobro promiješano i stavljeno u kadicu za elektroforezu. Nakon 10-15 minuta u kadicu s polimeriziranim gelom je stavljena 1x otopina MOPS-a, tako da prekrije gel.

Po jednom uzorku RNA pripremljena je otopina od 8,5 µl formamida, 2,5 µl formaldehida i 2,0 µl 10x MOPS-a, te pomiješano s 3 µl RNA (2-10 µg). Sve zajedno je stajalo 10 minuta na 60°C i 5 minuta na ledu. Za to vrijeme dodano je 3,0 µl pufera za nanošenje uzoraka i 1 µl etidij bromida (1 mg/ml). Napon pod kojim se odvijalo odvajanje molekula RNA bio je oko 8mV/cm.

3.5.3. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je *in vitro* sinteza jednolančane komplementarne DNA (cDNA) na temelju kalupa mRNA, pomoću enzima reverzne transkriptaze. Nakon nje obično slijedi umnažanje odsječka cDNA postupkom lančane reakcije polimerazom, pa se taj cijeli postupak naziva reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR, engl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*).

Kako bi se iz mRNA proizvela cDNA, 1 µl RNA (1-2 µg) pomiješan je s 1 µl početnice (2,5 pmol/µl) i 13 µl vode, zagrijano 7 minuta na 70°C i ohlađeno 1 minutu na ledu. Dodano je 9 µl smjese B (2,5 µl 10x reakcijskog pufera, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1,0 µl 10 mM smjese nukleotida i 2,5 µl 0,1 M DTT-a (ditiotreitol), promiješano i zagrijano 2 minute na 42°C. Dodan je 1 µl reverzne transkriptaze (Superscript II RT, Gibco), lagano promiješano i inkubirano 30 minuta na 42°C, zatim 15 minuta na 65°C i 5 minuta na 55°C. Nakon dodatka 1 µl ribonukleaze H (Gibco), nastavljeno je grijanje na 55°C 10 minuta. Reakcija je završena hlađenjem reakcijske smjese na ledu i smrzavanjem na -20°C. Za sintezu cDNA upotrijebljena je početnica specifična za mRNA *Stam2* (5' TAAACAGCACACCCACAAAG 3').

3.5.4. Hibridizacija RNA (northern blot)

Formaldehidni gel s razvučenom RNA ispran je dva puta po 15 minuta u 20x SSC i postavljen u stupac za prijenos RNA na membranu kapilarnim putem (jednako kao prijenos DNA na membranu). Prijenos RNA se odvijao preko noći na temperaturi 4°C. RNA je fiksirana na membranu izlaganjem UV svjetlosti s obje strane membrane po 1,5 minutu. Nakon toga, membrana je isprana u 2x SSC i osušena na fiter papiru.

Membrana s RNA prehibridizirana je u "High SDS" puferu za hibridizaciju (7% SDS, 0,1% N-lauroilsarkozin, 2% Blocking Reagent (Boehringer Mannheim), 5 mM Na fosfat, 5x SSC, 50% formamid) najmanje 1 sat na 50°C u hibridizacijskoj pećnici (OV5, Biometra) i zatim hibridizirana preko noći na 50°C u "High SDS" puferu za hibridizaciju kojem je dodana prethodno denaturirana DNA proba (10 minuta na 68°C). DNA proba upotrebljena za hibridizaciju s RNA označena je na isti način kao DNA probe za hibridizaciju s DNA.

Detekcija hibridizirane DNA probe na membrani s RNA bila je identična već opisanoj detekciji hibridizirane DNA probe na membrani s DNA.

3.6. Postupci s bjelančevinama

3.6.1. Priprema tkivnog homogenata

Životinja je žrtvovana cervikalnom dislokacijom i oko 200 mg tkiva izdvojeno i odmah smrznuto u tekućem dušiku. Smrznuto tkivo je stavljeno u 2 ml hladnog pufera za otapanje (150 mM NaCl, 50 mM Tris·Cl pH 8,0, 1% Igepal (Sigma), 2x Protease Inhibitor "Complete" (Roche)) i homogenizirano homogenizatorom Ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik) 30 sekundi pri najvećoj brzini. Homogenizirano tkivo je odloženo 10 minuta na led i potom centrifugirano 10 minuta na 14000 g pri temperaturi 4°C. Ukupni tkivni homogenat koji se nalazi u nadtalogu raspoređen je u manje volumene (200 – 300 µl), smrznut u suhom ledu i pohranjen na temperaturi -80°C.

3.6.2. Određivanje koncentracije bjelančevina Bradford-ovom metodom

U mikroepruvetama od 2 ml pripremljeno je po 100 µl serijskih razrjeđenja standardnih otopina bjelančevine BSA koncentracije 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml i 0.125 mg/ml, te 100 puta razrijeđenih uzoraka tkivnih homogenata (1 µl tkivnog homogenata i 99 µl destilirane vode). Svako razrijeđenje standarda i uzoraka tkivnih homogenata učinjeno je dva puta. U svaku mikroeprevetu dodano je po 1 ml pet puta razrijeđene otopine Bradford (BioRad), lagano promiješano i ostavljeno 10 minuta na sobnoj temperaturi.

Pomoću spektrofotometrijskog uređaja UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER (Camspec) izmjerena je apsorbancija svakog uzorka. Kao slijepa proba upotrijebljen je pufer za otapanje tkiva u kojem su inače otopljeni mjereni uzorci tkivnih homogenata. Na temelju izmjerene

apsorbancije i poznate koncentracije bjelančevina u standardnim otopina, načinjena je baždarna krivulja iz koje je očitana koncentracija ukupnih bjelančevina u pojedinim uzorcima tkivnih homogenata.

3.6.3. Elektroforeza bjelančevina u poliakrilamidnom gelu

Za analizu bjelančevina upotrijebljena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu. Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida, a stupanj umreženosti i veličina pora gela ovise o njihovim koncentracijama i međusobnom omjeru.

Elektroforeza je provedena u okomito postavljenoj aparaturi, gdje se gel nalazi između dvije staklene pločice, a uzorci se pod utjecajem električnog polja kreću kroz gornji gel za sabijanje i gel za razdvajanje (Criterion™ Precast Gel, 10% Tris·Cl, 1.0 mm; BioRad). Kao molekularni biljeg upotrijebljen je Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega).

Prije nanošenja na gel uzorci su pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka (20% SDS, 1 M DTT, 0,63 M Tris·Cl pH 7,0, 0,04% bromfenol, 10% saharoza, 10 mM EDTA) u omjeru 3:1 i zagrijani 3 minute na 99 °C. Elektroforeza se odvijala u puferu za elektroforezu (Tris 0,41 M, glicin 3,84 M, SDS 1%) 2-3 sata uz stalni napon od 100 mV.

3.6.4. Imunobojanje bjelančevina (Western blot)

Po završetku elektroforeze poliakrilamidni gel je odvojen od staklenih pločica i složen u kutiju za prijenos bjelančevina na membranu, zajedno s nitroceluloznom membranom Protran BA 85 (Schleicher & Schuell). Prijenos bjelančevina s gela na membranu odvijao se u puferu za prijenos (Tris 0,21 M, glicin 1,92 M, metanol 5%) u uređaju TRANS-BLOTT® CELL aparatu (BioRad) preko noći pri stalnom naponu od 40 mV.

Za provjeru učinkovitosti prijenosa, membrana je odmah nakon vađenja iz kutije uronjena u Ponceau otopinu (boja Ponceau S 0.1% (Sigma), octena kiselina 5%) na 10 minuta i potom isprana destiliranom vodom. Na membrani su se vidjeli tragovi bjelančevina koji su nakon dodatnog ispiranja destiliranom vodom postali nevidljivi.

Membrana s vezanim bjelančevinama inkubirana je 1 sat u otopini za blokiranje (2% mlijeko u prahu u puferu PBS) na tresilici, da se spriječi nespecifično vezanje protutijela na membranu. Nakon toga, membrana je inkubirana s otopinom primarnih protutijela na mišju bjelančevinu

STAM2 (36) razrijeđenih 1:600 u puferu PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, K_2HPO_4 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, Tween 20 0.02%) 2 sata na tresilici pri sobnoj temperaturi. Slijedilo je ispiranje 3 puta po 10 minuta u PBS-T-u, te 1 sat inkubiranja u otopini sekundarnih protutijela obilježenih peroksidazom iz hrena (Ab Antirabbit HRP, Promega) razrijeđenih 1:2500 u PBS-T-u. Membrana je nakon inkubacije s protutijelima isprana tri puta po 10 minuta u PBS-T-u i 10 minuta u PBS-u. Na ispranu membranu dodana je otopina supstrata za peroksidazu TMB Stabilized Substrate for HRP (Promega). Nakon što su se nakon nekoliko minuta na membrani pojavile bjelančevinske vrpce reakcija je prekinuta ispiranjem vodom. Membrana je poslije toga osušena na filter papiru i pohranjena u tamni prostor.

4. REZULTATI

4.1. Transgenična mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} - model za istraživanje izražaja gena *Stam2*

Mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} je transgenična mišja linija s preinačenim genom *Stam2* na način da je unutar tog gena ugrađen vektor genske zamke pKC199βgeo koji onemogućuje proizvodnju normalne bjelančevine STAM2, a time i njegovo djelovanje. Prisutnost gena biljega *lacZ* u vektoru genske zamke omogućuje praćenje izražaja preinačenog gena *Stam2* histokemijskim bojanjem na β-galaktozidazu.

U svrhu provjere hipoteze da je mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} odgovarajući model za istraživanje izražaja gena *Stam2* određivanjem aktivnosti enzima β-galaktozidaze trebalo je odgovoriti na sljedeća pitanja:

- a. je li gen *Stam2*, a posljedično i njegov transkript, promijenjen postupkom genske zamke?
- b. je li izražaj gena *Stam2* jedinstven, odnosno je li transkript gena preinačenog *Stam2* koji u sebi sadrži transkript vektora genske zamke ujedno i jedini transkript gena *Stam2* kod homozigotnih nosilaca preinake?

4.1.1. Genskom zamkom promijenjen je gen *Stam2* i njegova mRNA

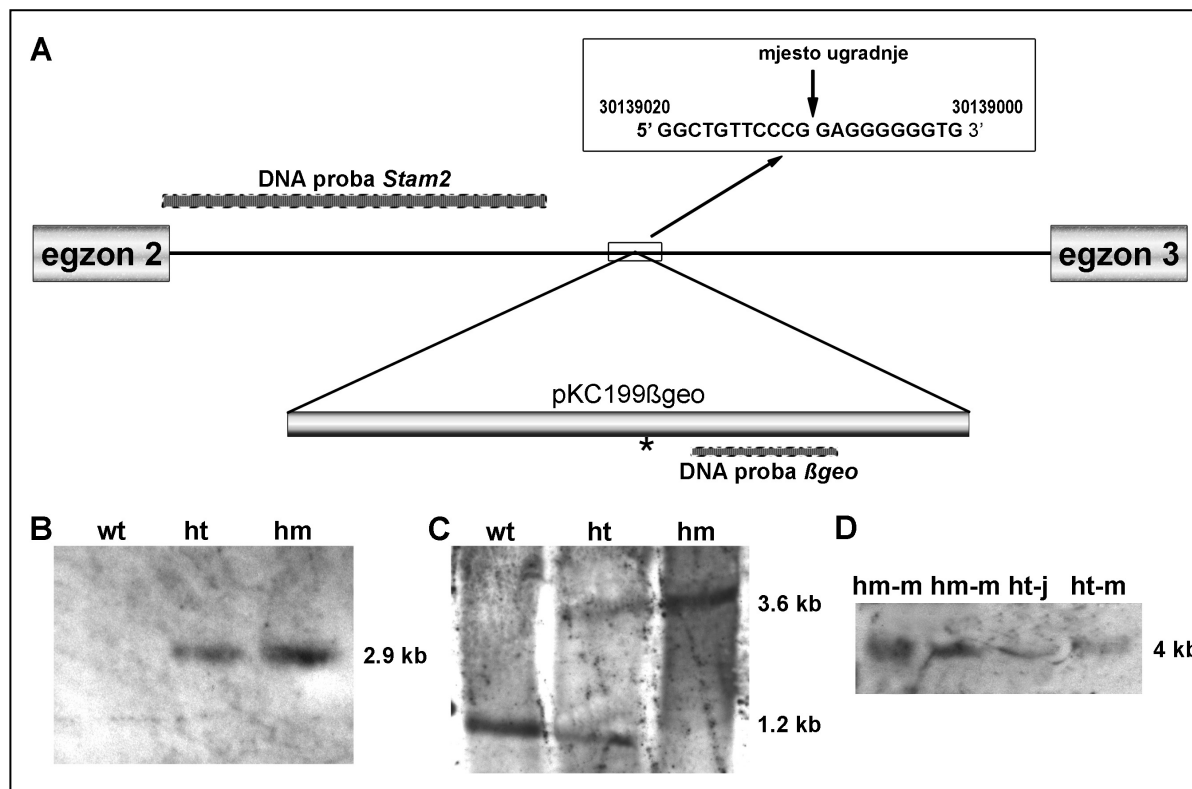
4.1.1.1. Vektor genske zamke ugrađen je između drugog i trećeg egzona gena *Stam2*

Umnoženi odsječci normalnog i preinačenog alela gena *Stam2*, koji su zatim klonirani i sekvencionirani, služili su za određivanje točnog mjesta ugradnje vektora genske zamke unutar gena *Stam2* postupkom lančane reakcije polimerazom. Za umnažanje odsječka preinačene genomske DNA na mjestu ugradnje vektora genske zamke upotrebljene su početnice 14B3 i lac2, a za umnažanje odgovarajućeg odsječka normalne genomske DNA upotrijebljene su početnice 14B3 i LOB5B (tablica 2). Rezultati lančanih reakcija polimerazom, te sekvencioniranja kloniranih odsječaka DNA pokazali su da je vektor genske zamke ugrađen u intron između drugog i trećeg egzona gena *Stam2* (slika 5A).

4.1.1.2. Vektor genske zamke ugrađen je u mišji genom u jednoj kopiji

Postupak „Southern blot“ proveden je s DNA probom βgeo specifičnom za vektorsku DNA (izrađenom pomoću početnica GC105 i GC106; tablica 2) da bi se provjerilo da je vektor genske

zamke ugrađen u mišji genom samo jednom, u jednoj kopiji, a ne na više mjesta ili u više kopija na jednom mjestu (slika 5A, B). Postupak hibridizacije je proveden na genomskoj DNA heterozigotnih i homozigotnih nosilaca preinake u *Stam2*, a kao kontrola poslužila je genomski DNA miševa divljeg tipa.



Slika 5. A. Shematski prikaz ugradnje vektora genske zamke unutar introna gena *Stam2* između drugog i trećeg egzona. Naznačene su DNA probe upotrijebljene u pokusima „Southern blot“, te mjesto ugradnje vektora između nukleotidnih baza 30139010 i 30139009 u drugom kromosomu (Genbank NT_039206). Mjesto rezanja enzima *Bgl*II upotrebljenog u pokusu prikazanom u B označeno je zvjezdicom (*). B. „Southern blot“ hibridizacija genomske DNA s DNA probom β geo. Vrpca veličine 2.9 kb predstavlja promijenjeni alel gena *Stam2* vidljiv kod homozigotnih (hm) i heterozigotnih (ht) miševa, ali ne i kod miševa divljeg tipa (wt). C. „Southern blot“ hibridizacija genomske DNA s DNA probom *Stam2*. Vrpca veličine 3.6 kb predstavlja promijenjeni alel gena *Stam2* vidljiv kod homozigotnih (hm) i heterozigotnih (ht) miševa, a vrpca veličine 1.2 kb predstavlja promijenjeni alel vidljiv kod heterozigotnih (ht) miševa i kod miševa divljeg tipa (wt). D. „northern blot“ hibridizacija RNA s DNA probom β geo. Vrpca veličine 4 kb predstavlja transkript promijenjenog alela gena *Stam2* vidljiv kod homozigotnih (hm) i heterozigotnih (ht) miševa. RNA je izolirana iz mozga homozigotnih miševa (hm-m), te iz jetre i mozga heterozigotnih miševa (ht-j i ht-m).

Ukupna genomski DNA pocijepana je restrikcijskim enzimom *Bgl*II koji reže vektorsku DNA samo jednom, u 5' smjeru od mjesta na koje se veže DNA proba (mjesto rezanja enzima *Bgl*II označeno je zvjezdicom na slici 5A). Iduće mjesto rezanja nalazi se u genomskoj DNA otprilike

2,9 kb nizvodno od označenog mjesta. U slučaju višestruke ugradnje vektora genske zamke u genom, rezultat restrikcije preinačene genomske DNA enzimom *BglI* bila bi dva ili više odsječaka DNA različite duljine koji vežu DNA probu *βgeo*. Slika 5B prikazuje jedinstven odsječak DNA duljine 2,9 kb u heterozigotnog i homozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2* što pokazuje da je vektor genske zamke ugrađen u jednoj kopiji u mišji genom.

Rezultati ovog pokusa pokazali su i da je signal za ugrađeni vektor genske zamke u heterozigotnih miševa slabiji nego u homozigotnih miševa, što je u skladu s pretpostavkom da su kod homozigota bila promijenjena oba alela gena *Stam2*, a kod heterozigota samo jedan.

4.1.1.3. Gen *Stam2* postoji samo u jednoj kopiji u mišjem genomu

U svrhu dokaza da je gen *Stam2* jedinstven u genomu miša, tj. da kod homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2* ne postoji dodatna, nepreinačena kopija tog gena proveden je postupak „Southern blot“ s DNA probom *Stam2* specifičnom za gen *Stam2* (izrađenom pomoću početnica 14B3 i LOB51; tablica 2) (slika 5A). Genomska DNA izolirana je iz jetre homozigotnih i heterozigotnih miševa, te miševa divljeg tipa i potom pocijepana restrikcijskim enzimom *SacI*. Dobiveni odsječci DNA su hibridizirani s DNA probom komplementarnom dijelu gena *Stam2* uzvodno od mjesta ugradnje vektora genske zamke.

Rezultati ovog pokusa pokazali su da miševi divljeg tipa posjeduju samo jedan, normalan alel gena *Stam2* (na slici 5C predstavljen odsječkom duljine 1,2 kb), dok homozigotni miševi posjeduju samo jedan, preinačeni alel istog gena (predstavljen odsječkom duljine 3,6 kb). Heterozigotni nosioci preinake u genu *Stam2* posjeduju oba navedena alela (slika 5C).

Prisutnost samo jednog hibridiziranog odsječaka DNA kod miševa divljeg tipa potvrđuje pretpostavku da je gen *Stam2* prisutan u samo jednoj kopiji u mišjem genomu. Utvrđeno je da homozigotni i heterozigotni miševi kao posljedicu ugradnje vektora genske zamke u gen *Stam2* posjeduju dodatni, uvećani alel tog gena što znači da je vektor genske zamke ugrađen baš gen *Stam2*. Pored toga, rezultati ove hibridizacije služe kao potvrda genotipizacije miševa provedene postupkom lančane reakcije polimerazom.

4.1.1.4. Preinačeni alel gena *Stam2* prepisuje se u promijenjenu mRNA

Kao dokaz da je vektor genske zamke svojom ugradnjom u gen *Stam2* uzrokovao stvaranje promijenjenog, stopljenog transkripta, proveden je postupak „northern blot“ s RNA izoliranom iz

heterozigotnih i homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2* (slika 5D). DNA proba β geo za hibridizaciju s RNA specifična je za vektor genske zamke (slika 5A).

Rezultat ovog postupka pokazao je da je kod heterozigotnih i homozigotnih miševa prisutan promijenjeni transkript očekivane duljine oko 4 kb (prva dva egzona gena *Stam2* stopljena s β geo), što potvrđuje da je vektor genske zamke ugrađen u gen *Stam2* u njegovom početnom dijelu (slika 5D).

4.1.2. Transkripti normalnog kao ni preinačenog gena *Stam2* nisu jedinstveni

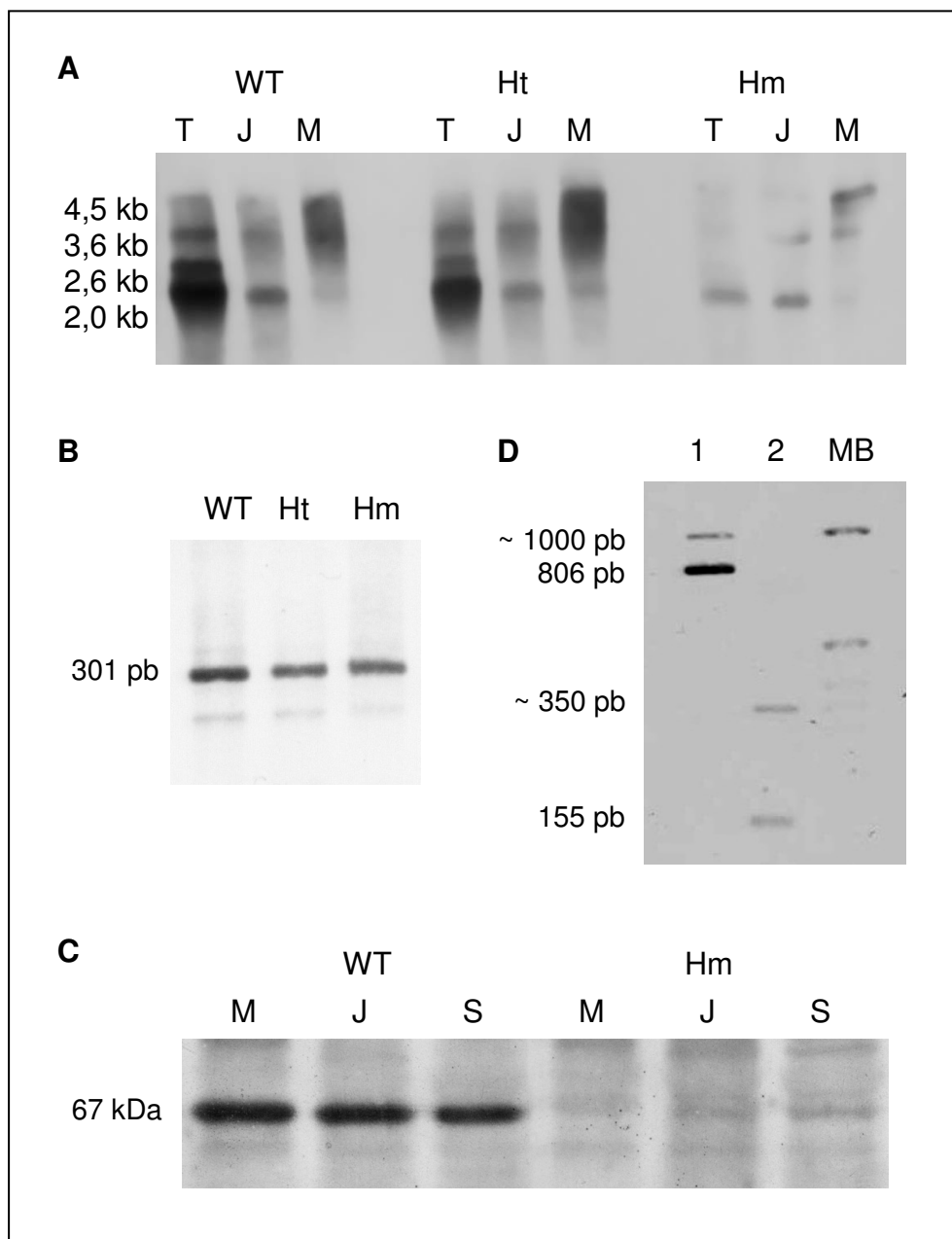
4.1.2.1. U homozigotnih nosilaca preinake genskom zamkom prisutan je i normalan transkript gena *Stam2*

Postupci „northern blot“ i RT-PCR provedeni su kao odgovor na pitanje dovodi li preinaka gena *Stam2* uvijek do stvaranja samo promijenjene mRNA koja u sebi sadrži transkript vektora genske zamke.

Postupkom „northern blot“ hibridizirana je DNA proba specifična za mRNA gena *Stam2* nizvodno od mjesta ugradnje vektora genske zamke (izrađena pomoću početnica LOBA3 i LOB5G; tablica 2) s ukupnom mRNA izoliranom iz testisa, jetre i mozga miševa divljeg tipa, te heterozigotnih i homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2*. U slučaju potpune djelotvornosti postupka genske zamke, uzorci mRNA iz homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2* ne bi pokazivali pozitivan signal vezanja DNA probe, jer ugrađeni vektor genske zamke ne dozvoljava prepisivanje gena *Stam2* nizvodno od mjesta ugradnje. Uzorci mRNA iz miševa divljeg tipa, a u nešto manjem intenzitetu i uzorci iz heterozigotnih miševa trebali bi pokazati pozitivnu reakciju, odnosno prisutnost cjelovitog transkripta gena *Stam2*.

Rezultati postupka „northern blot“ pokazali su da i homozigotni nosioci preinake u genu *Stam2* posjeduju malu količinu normalnog transkripta tog gena unatoč tome što ne posjeduju normalni alel gena *Stam2* (slika 6A). Prisutnost transkripata gena *Stam2* različitih veličina rezultat je različitog izrezivanja netranslatiranog područja na 3' kraju transkripta.

RT-PCR pomoću početnica 14B3 i LOB5C (tablica 2) kojima je umnožen odsječak mRNA nizvodno od mjesta ugradnje vektora genske zamke proveden je kao potvrda nalaza dobivenih postupkom „northern blot“ (slika 6B). Uzorci RNA izolirani su iz mozga miševa divljeg tipa, te heterozigotnih i homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2*. Ovim postupkom potvrđeno je postojanje normalnog transkripta gena *Stam2* i kod homozigotnih nosilaca preinake u tom genu.



Slika 6. **A.** „northern blot“ hibridizacija RNA s DNA probom specifičnom za *Stam2*. Vrpce različitih veličina predstavljaju normalne transkripte gena *Stam2* s različitim duljinama 3' netranslatirane regije (3'UTR). Vidi se da transkripti gena *Stam2* postoje i u organima homozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2*. RNA je izolirana iz testisa (T), jetre (J) i mozga (M) miševa divljeg tipa (WT), te homozigotnih (Hm) i heterozigotnih miševa (Ht). **B.** RT-PCR s početnicama specifičnim za dio mRNA koji bi trebao nedostajati u transkriptu preinačenog *Stam2* (zamijenjeno bijelo i crno). RNA je izolirana iz mozga miševa divljeg tipa (WT), te homozigotnih (Hm) i heterozigotnih miševa (Ht). **C.** „western blot“ ukupnih bjelančevina iz tkivnih homogenata mozga (M), jetre (J) i srca (S) miša divljeg tipa (WT) i homozigotnog miša (Hm) s protutijelom za bjelančevinu STAM2. Vrpca veličine 67 kDa u uzorcima tkiva iz miša divljeg tipa predstavlja STAM2, dok su slabo vidljive vrpce u uzorcima tkiva homozigotnog miša rezultat nespecifičnog vezanja protutijela. **D.** RT-PCR s dva različita para početnica (reakcije 1 i 2) kojim je otkriveno da u mozgu miševa divljeg tipa postoje dva transkripta gena *Stam2* različite duljine (zamijenjeno bijelo i crno). Očekivane su bile vrpce veličina 806 i 155 parova baza, a u svakoj reakciji se pojavila i dodatna vrpca za 189 parova baza dulja (~ 350 i ~ 1000 parova baza). **MB** – molekularni biljeg veličine odsječka DNA.

4.1.2.2. Postupkom western blot nije potvrđena prisutnost normalne bjelančevine STAM2 kod homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2*.

Prisutnost normalne mRNA gena *Stam2* kod homozigotnih nosilaca ne mora značiti da će se ona prevesti u bjelančevinu. Kako bi se provjerilo postoji li normalna bjelančevina STAM2 kod homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2* primijenjen je postupak „western blot“. U tom je postupku na ukupne bjelančevine izolirane iz mozga, jetre i srca miševa divljeg tipa, te homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2* primijenjeno protutijelo specifično za bjelančevinu STAM2.

Iz rezultata postupka „western blot“ vidljivo je da se u uzorku bjelančevina izoliranih iz miševa divljeg tipa nalazi bjelančevine veličine 67 kDa, što je očekivana veličina normalne bjelančevine STAM2, koja pozitivno reagira na specifično protutijelo za STAM2 (slika 6C). U uzorku bjelančevina izoliranih iz homozigotnih miševa ne postoji takva bjelančevina. Kako bi se provjerilo ne radi li se o lošim uzorcima bjelančevina, na iste je uzorke primijenjeno protutijelo specifično za bjelančevine HRS i STAM1, što je dalo pozitivan signal. Iz ovih se pokusa može zaključiti da homozigotni nosioci preinake u genu *Stam2* ne posjeduju bjelančevinu STAM2 u mjerljivoj količini. Stoga se, unatoč prisutnosti male količine normalnog transkripta gena *Stam2* kod homozigotnih nosilaca, onemogućavanje bjelančevine STAM2 postupkom genske zamke može smatrati zadovoljavajuće djelotvornim.

4.1.2.3. Alternativno prekrajanje odvija se tijekom transkripcije gena *Stam2*

Postupkom RT-PCR s mRNA izoliranom iz miševa divljeg tipa otkriveno je da postoje dva različita transkripta tog gena. Kako bi se pokazalo da se radi o alternativnom prekrajanju transkripta gena *Stam2*, a ne o tragovima zaostale genomske DNA u uzorku RNA, provedena je lančana reakcija polimerazom s cDNA iz mozga miševa divljeg tipa pomoću početnica 14A3 i 14A5, te LOB3P i LOB5F (tablica 2; slika 6D). Razlika u duljini umnoženih odsječaka cDNA, koja je predstavljala duljinu dodatnog egzona, bila je u obje reakcije oko 200 parova baza.

U cilju karakterizacije otkrivenog egzona kloniran je veći odsječak DNA dobiven lančanom reakcijom polimerazom s početnicama LOB3P i LOB5F (tablica 2), te mu je određen redoslijed nukleotida. Pokazano je da se radi o dotad neotkrivenom alternativnom egzonu duljine 189 parova baza čiji redoslijed nukleotida odgovara redoslijedu nukleotida dijela introna smještenog između prvog i drugog egzona gena *Stam2* (76). Stoga je taj alternativni egzon nazvan egzon 1A (GeneBank DQ141211). (slika 7A).

Već opisan postupak „western blot“ pokazao je da u uzorku bjelančevina izoliranih iz miševa divljeg tipa nisu vidljive bjelančevine koje bi specifično vezale protutijelo na STAM2, što znači da se transkript gena *Stam2* s dodatnim egzonom 1A ne prevodi u neki oblik bjelančevine STAM2 u mjerljivoj količini, te da taj alternativni transkript nema utjecaja na stvaranje normalne bjelančevine STAM2.

Svi navedeni pokusi pokazali su da je postupkom genske zamke preinačen mišji gen *Stam2*, te da se ta preinaka prepisuje i na razinu mRNA, što rezultira izostankom stvaranja normalne bjelančevine STAM2. To pokazuje da je transgenična mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} odgovarajući model za proučavanje izražaja gena *Stam2* i istraživanje njegove uloge kod miša.

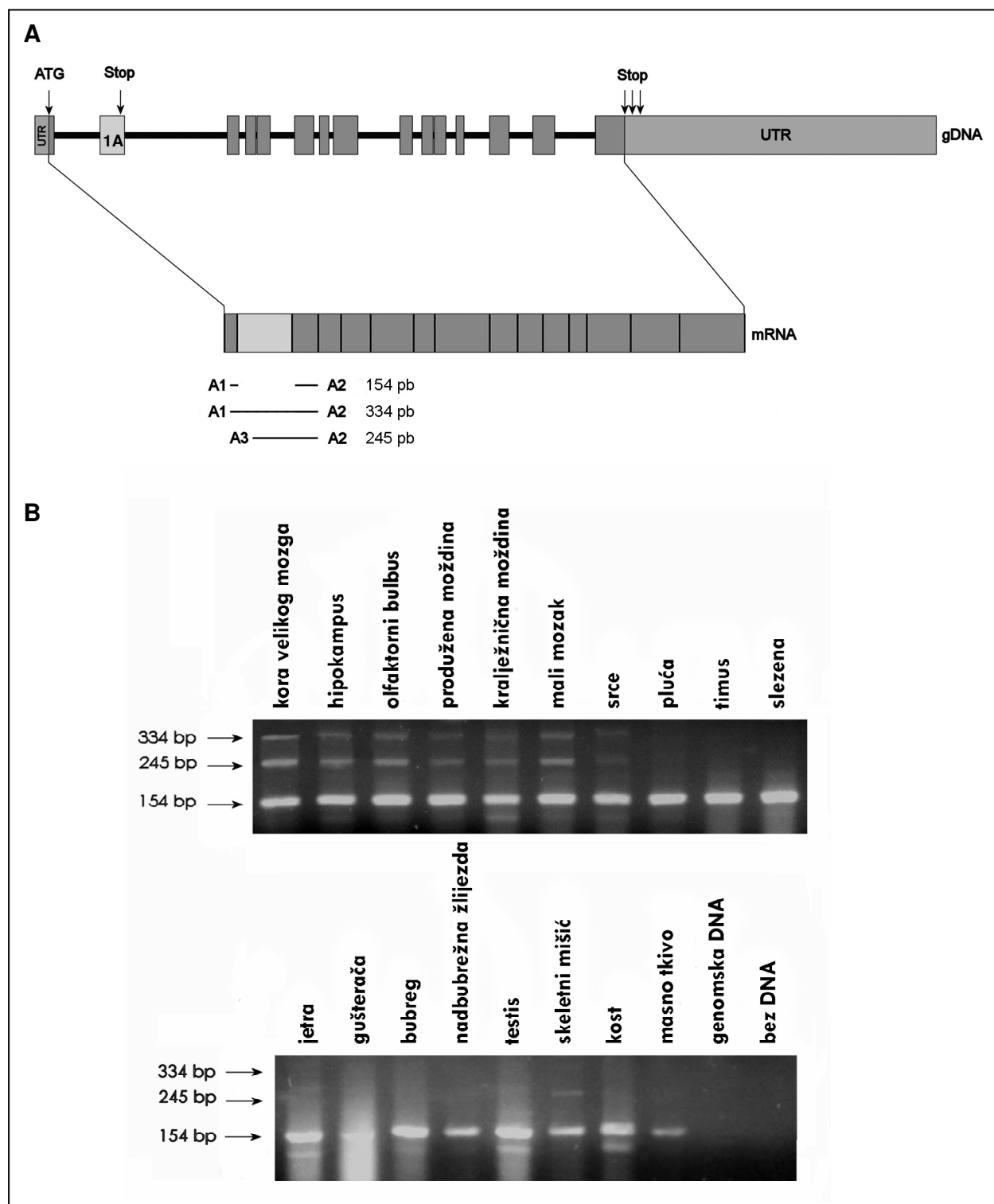
4.2. Izražaj gena *Stam2*

Proučavanje izražaja gena nužan je preduvjet u otkrivanju uloge nekog gena. Poznavanjem rasprostranjenosti izražaja gena moguće je ciljano usmjeriti istraživanje uloge gena na područja njegova izražaja. Osnovna slika izražaja gena u mišjem organizmu dobiva se analizom prisutnosti transkripta tog gena u različitim organima odraslog miša. To je najjednostavnije učiniti postupkom RT-PCR.

4.2.1. Gen *Stam2* izražen je u svim ispitivanim organima odraslog miša

Kako bi se istražila rasprostranjenost transkripta gena *Stam2* u organima odraslog miša primijenjen je postupak RT-PCR. Također se ovim postupkom istovremeno proučavao izražaj oba transkripta gena *Stam2*. Kako bi se normalni transkript razlikovao od alternativnog (s dodanim alternativnim egzonom 1A), u reakciju su stavljene tri početnice: A1, A2 i A3 (tablica 2; slika 7A). Početnice A1 i A2 umnažaju odsječak transkripta s uključenim egzonom 1A i odsječak transkripta bez egzona 1A, dok početnice A1 i A3 specifično umnažaju samo odsječak transkripta s uključenim egzonom 1A. Tako uzorci mRNA s prisutna oba transkripta pokazuju tri različita DNA odsječka (veličine 154, 245 i 334 parova baza), dok uzorci u kojima je prisutan samo normalan transkript bez egzona 1A pokazuje samo odsječak veličine 154 parova baza.

Ovaj je pokus pokazao da se normalan transkript bez egzona 1A nalazi u svim analiziranim organima miša. Transkript gena *Stam2* s dodatnim egzonom 1A, za koji je pokazano da se ne prevodi u bjelančevinu STAM2, pojavljuje se u kori velikog mozga, hipokampusu, malom mozgu, olfaktornim bulbusima, kralježničnoj moždini, te skeletnom i srčanom mišiću (slika 7B).



Slika 7. A. Shematski prikaz rasporeda intronskog i egzonskog slijeda (pravokutnici) u genu *Stam2* te njegovog transkripta. Alternativni egzon 1A prikazan je kao svjetliji pravokutnik. Naznačene su početnice upotrijebljene u reakciji RT-PCR prikazanoj u B. ATG – start kodon, UTR – netranslatirajuće područje, STOP – stop kodon. **B.** RT-PCR s RNA izoliranom iz organa miševa divljeg tipa i početnicama A1, A2 i A3 koje daju tri vrpce različitih veličina. Vrpca veličine 154 parova baza predstavlja transkript *Stam2* bez ugrađenog alternativnog egzona. Vrpce veličine 245 i 334 parova baza predstavljaju transkript *Stam2* s ugrađenim alternativnim egzonom.

4.2.2. Izražaj *Stam2* u mišjim zamecima postupkom histokemijskog bojanja na enzim β -galaktozidazu

U cilju analize izražaja gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja provedeno je histokemijsko bojanje zametaka transgenične mišje linije *Stam2^{Gt1Gaj}*. Analizom su obuhvaćeni zameci u starosti od 8,5 do 18,5 dana. Analizirano je 11 različitih razvojnih stadija, s razlikom između stadija po 1 dan (Tablica 4). Na taj način bilo je moguće pratiti promjene u izražaju tijekom razvitka.

Ispitivana skupina zametaka bili su heterozigotni nosioci preinake u genu *Stam2*. Dobiveni su parenjem ženki divljeg tipa i mužjaka heterozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2*. Budući da je 50% potomaka takvih parenja heterozigotno, a 50% potomaka je divljeg tipa, zameci istog legla s genotipom divljeg tipa poslužili su kao kontrolna skupina u postupku histokemijskog bojanja.

Histokemijsko određivanje uzorka izražaja gena *Stam2* temelji se na prisutnosti gena biljega *lacZ* (gen za enzim β -galaktozidazu) u ugrađenom vektoru genske zamke pKC199 β geo. Izražaj *lacZ* vjerno oslikava izražaj promijenjenog gena *Stam2*, a može se jednostavno odrediti dodatkom supstrata za enzim β -galaktozidazu, koji svojom aktivnošću mijenja boju u plavu.

4.2.2.1. Zameci stari 8,5 dana (E8,5)

U prvih osam dana embrionalnog razvoja mišjih zametaka uspostavljena su gastrulacijom tri zametna listića i započela je neurulacija. Osmog dana razvoja nastaju prvi somiti i započinje zatvaranje neuralne cijevi. U dobi od 8,5 dana mišji zameci imaju već preko osam somita i ulaze u proces ventralnog savijanja zametnog cilindra, čime svoj udubljeni položaj mijenjaju u položaj kakav imaju zameci svih ostalih kralješnjaka, ektoderm izvana, a endoderm iznutra. U to vrijeme se intenzivno razvija srčana cijev koja poprima oblik slova S. U ventralnom dijelu zametka razvija se primitivno crijevo, a u dorzalnom se neuralna cijev nastavlja zatvarati prema kranijalno i prema kaudalno.

Histokemijsko bojanje na β -galaktozidazu zametaka starih 8,5 dana provedeno je na tri legla zametaka s jednakim udjelom zametaka heterozigota i zametaka divljeg tipa. Ni u jednom leglu bojanje nije dalo pozitivnu reakciju, dok je u istovremenom pokusu bojanje dalo pozitivnu reakciju u starijih zametaka. Zaključeno je da u zamecima starim 8,5 dana nema vidljivog izražaja gena *Stam2*.

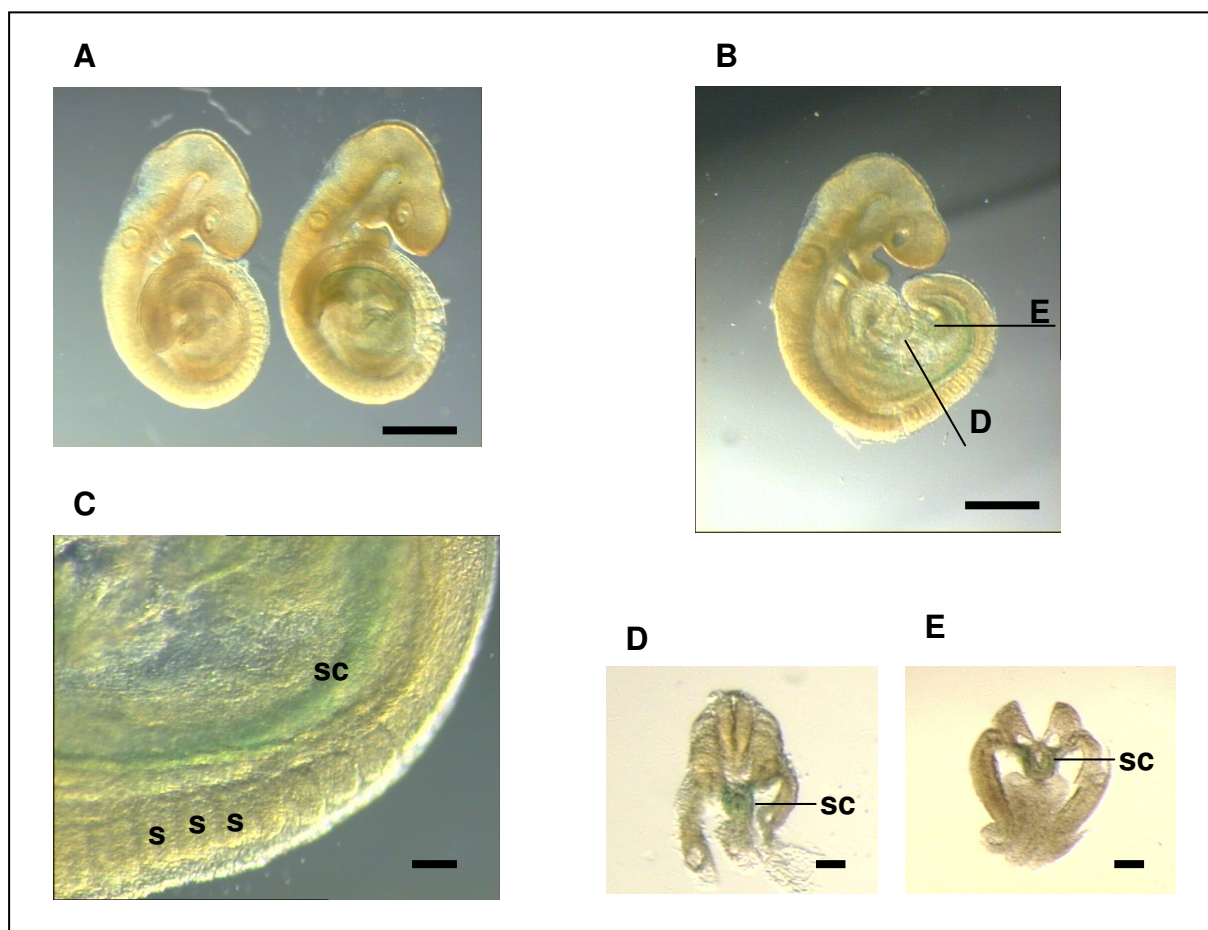
4.2.2.2. Zameci stari 9,5 dana (E9,5)

U dobi od 9,5 dana mišji zameci posjeduju preko 20 somita. Na ovom stadiju zameci imaju razvijene moždane mjehuriće, te je područje glave značajno povećano u odnosu na druge dijelove tijela. Pojavljuju se osnove prednjih udova, a u osnovi srca se oblikuje primitivni ventrikul, te dolazi do stvaranja trabekula u primitivnom atriju. Primitivno crijevo se i dalje razvija, pri čemu je prednje crijevo razvijenije od stražnjeg. Urogenitalni nabori nastali 9. dana starosti, su se povećali.

Izražaj gena *Stam2* prvi se puta pojavljuje u zamecima starim 9,5 dana. β -glaktozidaza aktivna je u ograničenom području s ventralne strane kaudalnog dijela zametaka. Na poprečnim presjecima kroz zametak se ovo područje izražaja prepoznalo kao stražnje crijevo (slika 8).

Tablica 3. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 9,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E9,5	
neuralna cijev	–
moždani mjehurići	–
srce	–
crijevo (stražnje)	+
urogenitalni nabor	–
prednji udovi	–



Slika 8. **A.** Usporedba zametka E9,5 divljeg tipa (lijevo) s heterozigotnim nosiocem preinake u *Stam2* iz istog legla (desno). **B.** Cijeli zametak s izražajem *Stam2* u stražnjem crijevu i označenim presjecima prikazanim u D i E. **C.** Stražnji dio zametka na kojem je vidljiv položaj stražnjeg crijeva s aktivnom β -galaktozidazom. **D, E.** Presjeci kroz stražnji dio zametka s vidljivim presjecima kroz plavo-zeleno obojeno stražnje crijevo. s – somiti; sc – stražnje crijevo. Crta mjerila u A i B – 1 mm; u C, D i E – 0,1 mm.

4.2.2.3. Zameci stari 10,5 dana (E10,5)

Zameci u dobi od 10,5 dana prolaze kroz intenzivan razvoj živčanog sustava, uključujući razvoj oka (diferencijacija očne leće) i uha, te pojavu spinalnih i vegetativnih ganglija. U to vrijeme dolazi do odvajanja Ratkeove vreće od orofaringealnog područja i početnog formiranja gornje i donje čeljusti. U ovom stadiju dolazi do zatvaranja kaudalnog neuroporusa, a zameci posjeduju i osnove stražnjih udova. Srce i krvne žile su razvijeniji u odnosu na prethodni stadij; iz škržnih lukova nastale su osnove plućnih arterija. Iz primitivnog crijeva diferencirale su se osnove štitnjače i pluća; u osnovi jetre vidljiva je hematopoetska aktivnost.

U zametaka starih 10,5 dana aktivnost β -galaktozidaze nije više prisutna u stražnjem crijevu, a pojavljuje se u srcu. Izražaj *Stam2* u srcu zadržat će se sve do okota i nastaviti dalje u odraslu dob (slika 9).

Tablica 4. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 10,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E10,5			
notokord	–	crijevo	–
neuralna cijev	–	štitnjača	–
moždani mjehurići	–	pluća	–
spinalni gangliji	–	jetra	–
oko	–	urogenitalni nabor	–
uho	–	prednji udovi	–
srce	+	stražnji udovi	–



Slika 9. Usporedba zametka E10,5 divljeg tipa (lijevo) s heterozigotnim nosiocem preinake u *Stam2* (desno) iz istog legla. Plavo-zeleno obojenje vidljivo je samo u srcu heterozigotnog zametka. s – srce. Crta mjerila - 1 mm.

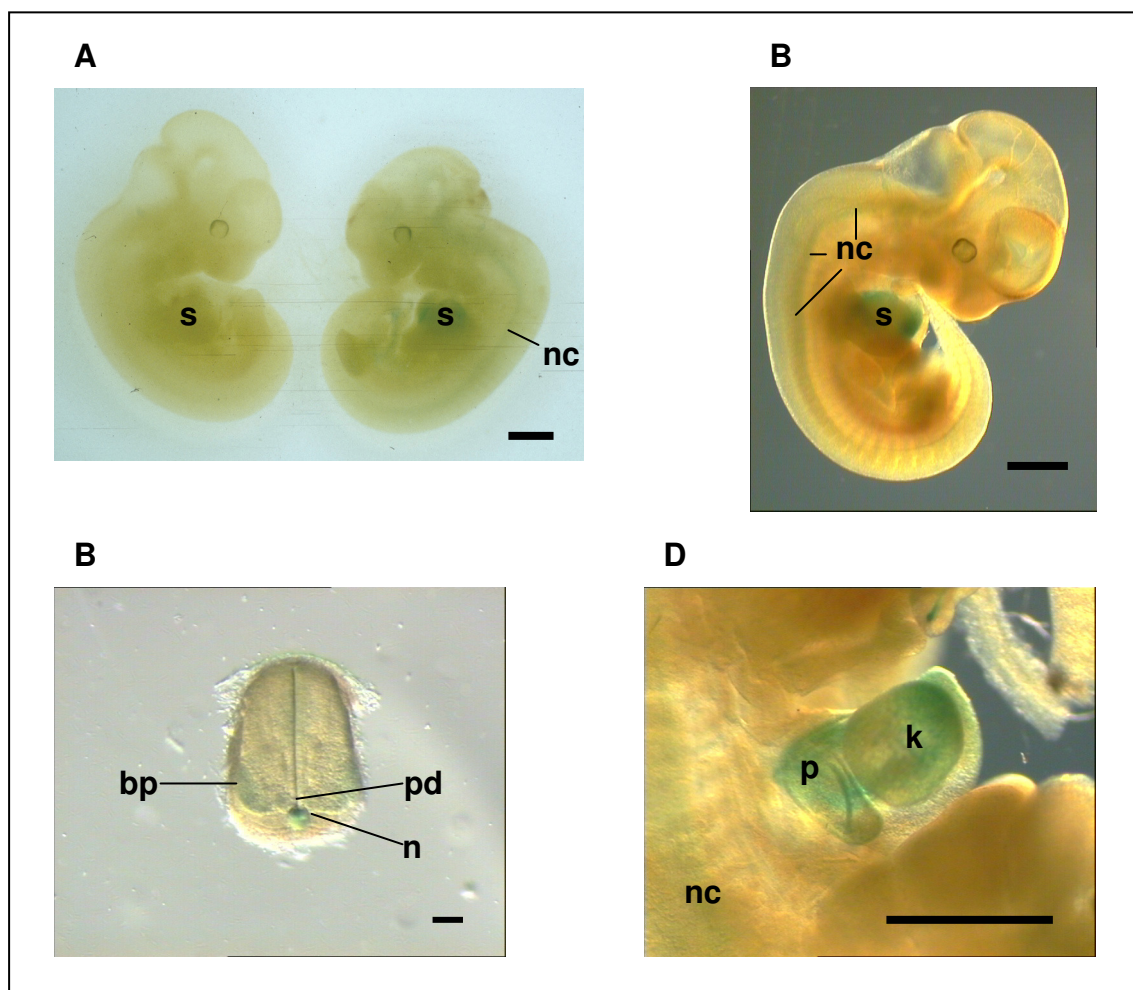
4.2.2.4. Zameci stari 11,5 dana (E11,5)

Kod zametaka starih 11,5 dana telencefalon je podijeljen u dvije jasno odvojene i lagano izbočene hemisfere. Osnova kralježnične moždine uglavnom se sastoji od sive tvari, dok se bijela tvar nalazi u tankom vanjskom sloju. Bazalne ploče (budući ventralni rogovi sive tvari) su izražene, dok je krilna ploča (budući dorzalni rogovi sive tvari) ograničena na malo područje. Prednji udovi su podijeljeni u dva područja, proksimalno i distalno. Od distalnog će nastati šapica. Osnove oka su dobro vidljive zbog pojave pigmentnih stanica u vanjskom sloju mrežnice.

Pored izražaja u srcu, zameci stari 11,5 dana po prvi puta pokazuju izražaj *Stam2* i u živčanom sustavu (slika 10). Aktivnost β -galakozidaze primjećuje se u notokordu, te u neuralnoj cijevi zametka. Unutar neuralne cijevi njena je aktivnost ograničena na područje ploče dna i bazalnih ploča (slika 10C).

Tablica 5. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 11,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E11,5			
notokord	+	srce	+
neuralna cijev (raphe)	–	crijevo	–
neuralna cijev (ploča dna)	+	štitnjača	–
neuralna cijev (bazalne ploče)	+	pluća	–
neuralna cijev (krovnna ploča)	–	jetra	–
telencefalon	–	urogenitalni nabor	–
spinalni gangliji	–	prednji udovi	–
oko	–	stražnji udovi	–
uho	–		



Slika 10. **A.** Usporedba zametka E11,5 divljeg tipa (lijevo) s heterozigotnim nosiocem preinake u *Stam2* (desno) iz istog legla. **B.** Cijeli zametak s izražajem *Stam2* u srcu i neuralnoj cijevi. **C.** poprečni presjek kroz neuralnu cijev i notokord zametka s vidljivim plavo-zelenim obojenjem u području notokorda, ploče dna i bazalnih ploča. **D.** Izražaj *Stam2* u srcu i neuralnoj cijevi zametka E11,5. **s** – srce, **nc** – neuralna cijev, **bp** – bazalna ploča, **pd** – ploča dna, **n** - notokord, **p** – pretklijetka, **k** – klijetka. Crta mjerila u A, B i D – 1 mm; u C – 0,1 mm.

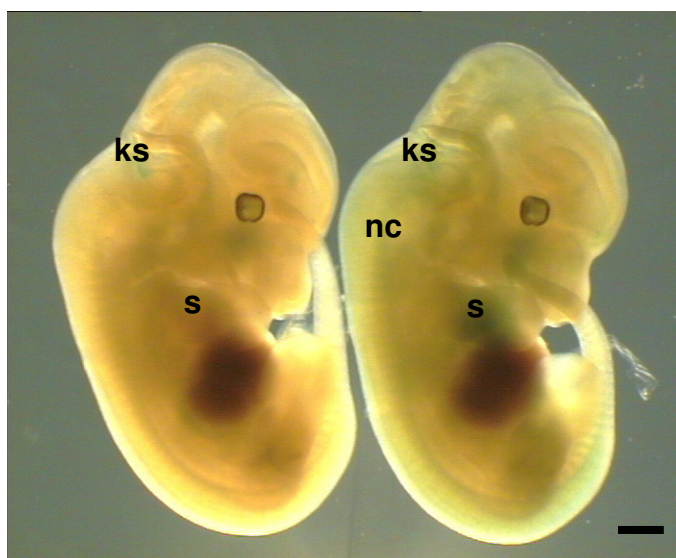
4.2.2.5. Zameci stari 12,5 dana (E12,5)

U dobi od 12,5 dana pojedini dijelovi mozga zametka već su jasno izraženi. Parni mjehurići telencefalona se šire prema naprijed i postranično od treće moždane komore. Diferenciraju se područja hipotalamusa i talamusa, a corpus striatum naglo raste. Pojavljuje se i koroidni splet koji se razvija iz krovne ploče četvrte moždane komore u području stražnjeg mozga. Od derivata primitivnog crijeva intenzivno raste jezik, dušnik se grana na dva bronha, razvija se štitna žlijezda, nazire se začetak timusa i gušterače, dok je jetra već razvijen organ koji zauzima velik dio trbušne šupljine. Bubrež se nalazi na stadiju mezonefroza u kojem postoje cjevaste strukture, no još uvijek nema glomerula. Osnove spolnih žlijezda su formirane, ali se ne vidi razlika između testisa i jajnika .

Izražaj *Stam2* kod zametaka starih 12,5 dana približno odgovara izražaju tog gena kod 11,5 dana starih zametaka. *Stam2* izražen je u srcu i neuralnoj cijevi. Izražaj nije više prisutan u notokordu. U neuralnoj cijevi osim izražaja u ploči dna i bazalnim pločama, izražaj je prisutan i u krovnoj ploči. Stoga su područja izražaja koja su ista kao i u prethodnom stadiju: srce, ploča dna i bazalna ploča neuralne cijevi, novo područje izražaja je krovna ploča neuralne cijevi, a izražaj više nije prisutan u notokordu (slika 11). U zametaka oba genotipa (heterozigot i divlji tip) pojavljuje se pozitivna reakcija na bojanje X-gal-om u području tek nastalog koroidnog spleta, što predstavlja pozadinsko bojanje i ne smatra se područjem izražaja gena *Stam2*.

Tablica 6. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 12,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E12,5			
notokord	–	crijevo	–
neuralna cijev (raphe)	–	jezik	–
neuralna cijev (ploča dna)	+	štitnjača	–
neuralna cijev (bazalne ploče)	+/-	pluća	–
neuralna cijev (krovna ploča)	+	timus	–
telencefalon	–	jetra	–
spinalni gangliji	–	gušterača	–
oko	–	spolne žlijezde	–
uho	–	prednji udovi	–
srce	+	stražnji udovi	–



Slika 11. Zametak E12,5 divljeg tipa (lijevo) i heterozigotni nosilac preinake u *Stam2* (desno) iz istog legla. Izražaj *Stam2* prisutan je u neuralnoj cijevi i srcu heterozigotnog zametka. Koroidni splet pokazuje pozitivnu reakciju u oba zametka, pa se to smatra pozadinskim bojanjem. **s** – srce, **nc** – neuralna cijev, **ks** – koroidni splet. Crta mjerila - 1 mm.

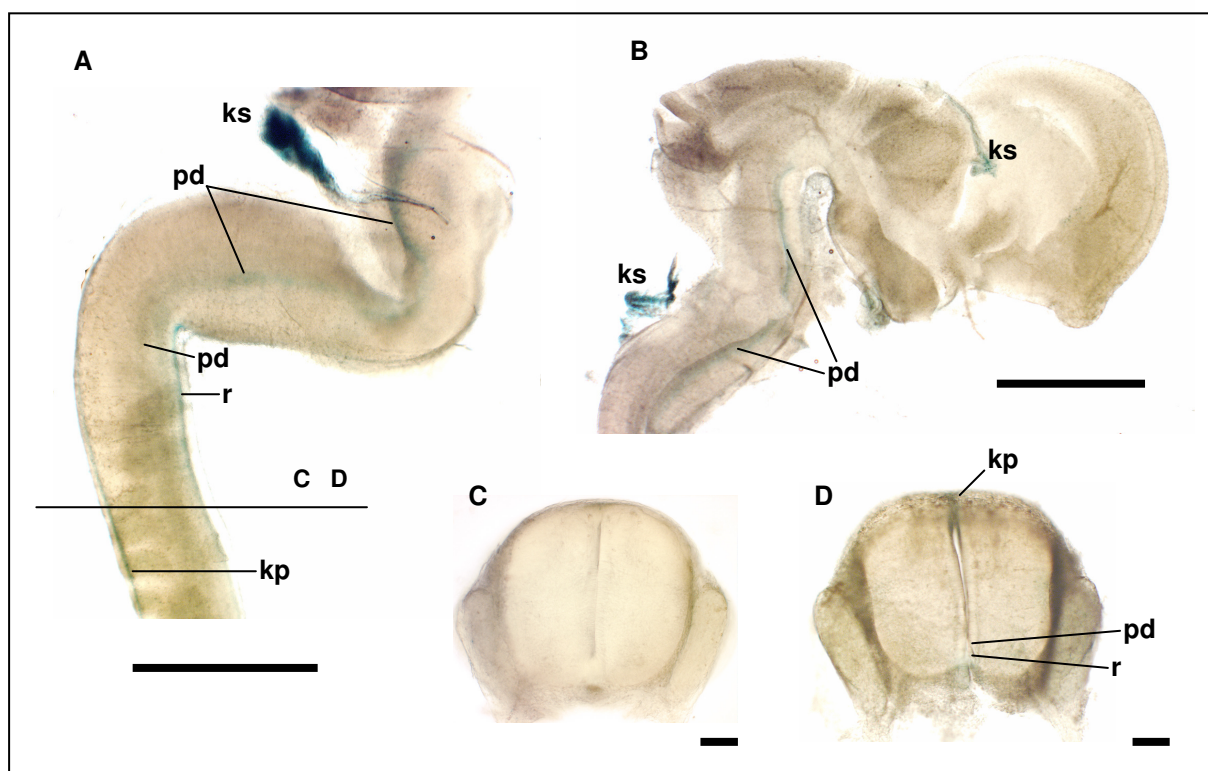
4.2.2.6. Zameci stari 13,5 dana (E13,5)

Vanjski izgled zametaka starih 13,5 dana već podsjeća na odrasle miševe, posebno područje lica. Svi glavni dijelovi prednjeg mozga naglo rastu i razvijaju se, a razvija se i hipofiza. Područja sive tvari (bazalna i krilna ploča) zauzela su odgovarajuće položaje gdje će se iz njih razviti dorzalni i ventralni rogovi kralježnične moždine. U to se vrijeme nastavlja intenzivna diferencijacija svih organa (timus, probavna cijev, pluća, srce, gušterača, jetra, bubreg). Pri tome se događa i odgovarajuća vaskularizacija i inervacija tih organa. Sa 13,5 dana prvi puta je moguće razlučiti testis od jajnika zbog pojave vidljivih cjevčica (tračaka) u testisu. Zgušnjavanjem mezenhima započinje proces okoštavanja lubanje zametaka.

Usporedo s napredovanjem organogeneze u zametaka starih 13,5 dana, pored izražaja u budućoj kralježničnoj moždini i srcu, izražaj *Stam2* se pojavljuje i u ploči dna moždanog debla (medulla oblongata i pons) (slika 12). U kralježničnoj moždini izražaj *Stam2* se iz ploče dna širi na područje raphe. Izražaj *Stam2* u bazalnim pločama kralježnične moždine prestaje u ovom stadiju. Nazire se slaba aktivnost β -galaktozidaze u testisima.

Tablica 7. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 13,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E13,5			
notokord	–	crijevo	–
kralježnična moždina (raphe)	+	jezik	–
kralježnična moždina (ploča dna)	+	štitnjača	–
kralježnična moždina (bazalne ploče)	–	pluća	–
kralježnična moždina (krovnna ploča)	+	timus	–
produžena moždina , most (raphe)	–	jetra	–
produžena moždina, most (ploča dna)	+	gušterača	–
mali mozak	–	bubreg	–
telencefalon	–	testis	+
oko	–	jajnik	–
uho	–	koža	–
spinalni gangliji	–	prednji udovi	–
hipofiza	–	stražnji udovi	–
srce	+		



Slika 12. A. Moždano deblo heterozigotnog zametka s označenim mjestom presjeka prikazanih u C i D. B. Sagitalni presjek kroz središnji živčani sustav heterozigotnog zametka E13,5. C. Poprečni presjek kroz osnovu kralježnične moždine zametka divljeg tipa. D. Poprečni presjek kroz kralježničnu moždinu heterozigotnog zametka. Vidljivo je slabo plavo-zeleno obojenje u području ploče dna i raphe, te u području krovne ploče. **pd** – ploča dna, **ks** – koroidni splet, **r** – raphe, **kp** – krovna ploča. Crta mjerila u A i B – 1 mm; u C i D – 0,1 mm.

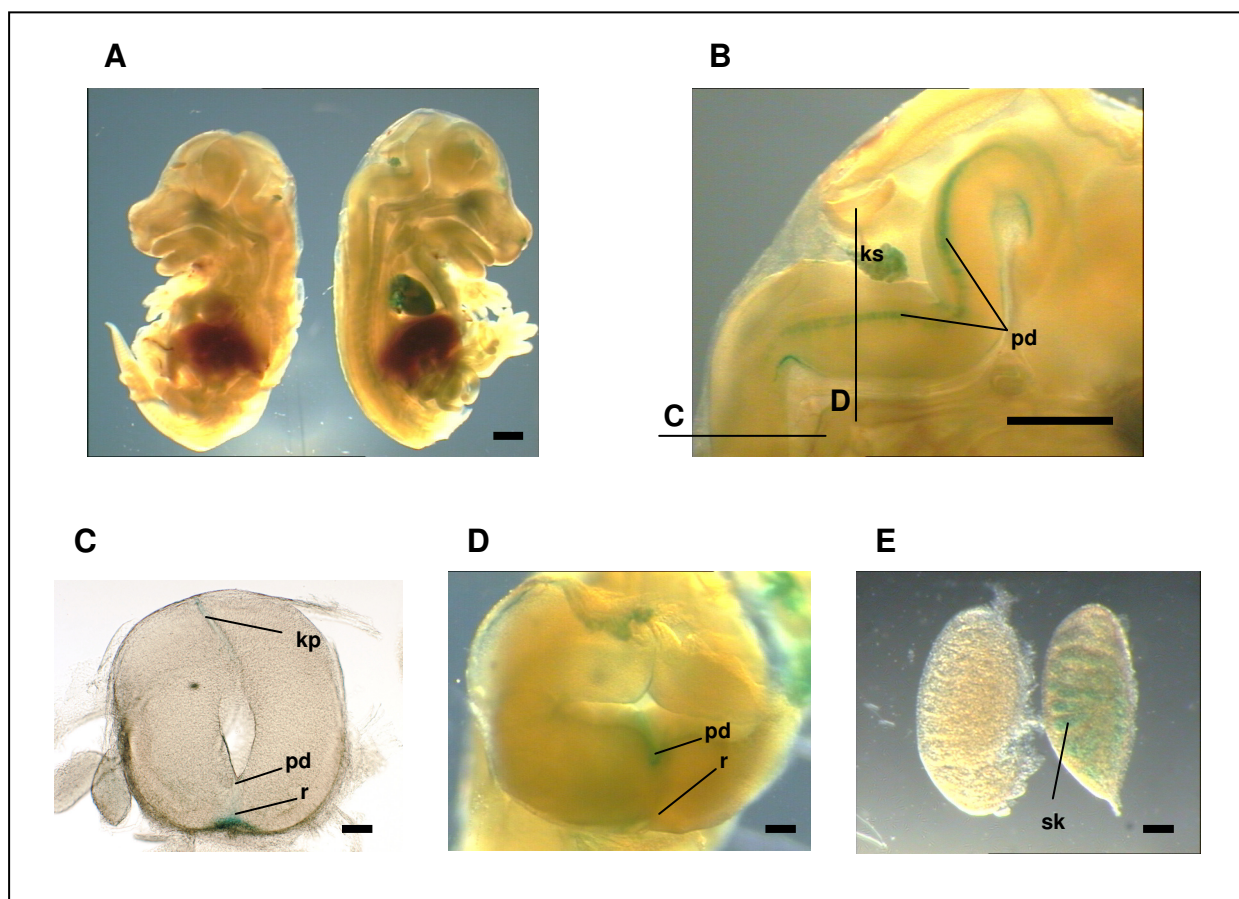
4.2.2.7. Zameci stari 14,5 dana (E14,5)

S 14,5 dana u osnovi velikog mozga započinje seljenje stanica iz ventrikularne u intermedijarnu zonu i stvara se kortikalna ploča. Pojavljuju se osnove malog mozga i olfaktornih bulbusa, a koroidni splet raste i širi se. U ovom razvojnem stadiju vidljiva je većina kranijalnih i spinalnih ganglija, dok se, osim onih najvećih, periferni živci jedva zamijećuju. Osnova kralježnične moždine u ovom stadiju prolazi kroz daljnju diferencijaciju, smanjuje se promjer središnjeg kanala i povećava obujam bijele tvari. Razvija se nadbubrežna žlijezda. Po skeletu zametaka stvaraju se centri okoštavanja, a na prednjim i stražnjim udovima vidljivi su pojedinačni prsti. Na jeziku se pojavljuju prve listaste papile.

Izražaj *Stam2* je kod zametaka starih 14,5 dana i dalje prisutan u kralježničnoj moždini, moždanom deblu, srcu i testisu (slika 13). U moždanom deblu se usporedo s podizanjem ploče dna od ventralnog ruba pojavljuje slabi izražaj *Stam2* u području raphe (13D). U testisima je aktivnost β -galaktozidaze vidljivo izražena u budućim sjemenskim kanalićima (slika 13E).

Tablica 8. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 14,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E14,5			
notokord	–	crijevo	–
kralježnična moždina (raphe)	+	jezik	–
kralježnična moždina (ploča dna)	+	štitnjača	–
kralježnična moždina (bazalne ploče)	–	pluća	–
kralježnična moždina (krovnna ploča)	+	timus	–
produžena moždina , most (raphe)	+	jetra	–
produžena moždina, most (ploča dna)	+	gušterača	–
mali mozak	–	bubreg	–
telencefalon	–	nadbubrežna žlijezda	–
oko	–	testis	+
uho	–	jajnik	–
spinalni gangliji	–	koža	–
hipofiza	–	prednji udovi	–
srce	+	stražnji udovi	–



Slika 13. **A.** Sagitalni presjek kroz zametke E14,5 divljeg tipa (lijevo) i heterozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2* (desno). **B.** Sagitalni presjek kroz moždano deblo i gornji dio kralježnične moždine heterozigotnog zametka s označenim presjecima u C i D. Vidljiva je intenzivna aktivnost β -galaktozidaze u području ploče dna moždanog debla. **C.** Poprečni presjek kroz kralježničnu moždinu heterozigotnog zametka. Slabo plavo-zeleno obojenje prisutno je u području ploče dna i raphe, te je jedva vidljivo u području krovne ploče. **D.** Poprečni presjek kroz moždano deblo heterozigotnog zametka. **E.** Usporedba aktivnosti β -galaktozidaze u testisima zametaka divljeg tipa (lijevo) i heterozigota (desno). Izražaj *Stam2* ograničen je na buduće sjemenske kanaliće testisa. **pd** – ploča dna, **ks** – koroidni splet, **r** – raphe, **kp** – krovna ploča, **sk** – sjemenski kanalić. Crta mjerila u A i B – 1 mm; u C, D i E – 0,1 mm.

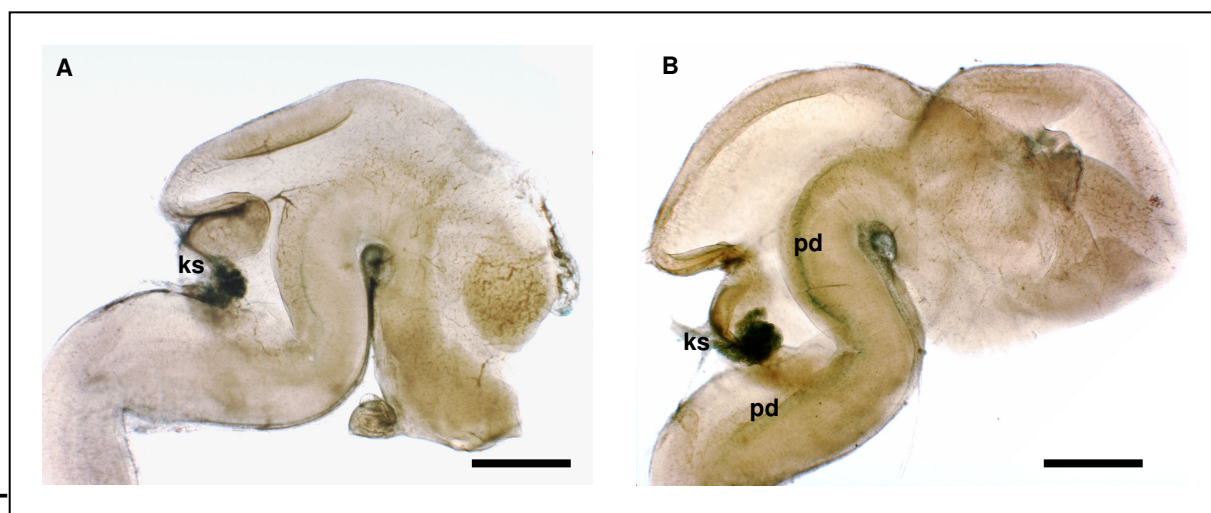
4.2.2.8. Zameci stari 15,5 dana (E15,5)

Na stadiju E15,5 nastavlja se diferencijacija slojeva kore velikog mozga. Svi organi ulaze u fazu završne diferencije. Na koži se pojavljuju folikuli dlaka. Jajnici su u ovom stadiju već značajno manji od testisa i postepeno ih okružuje tkivo paramezonefričkog kanala.

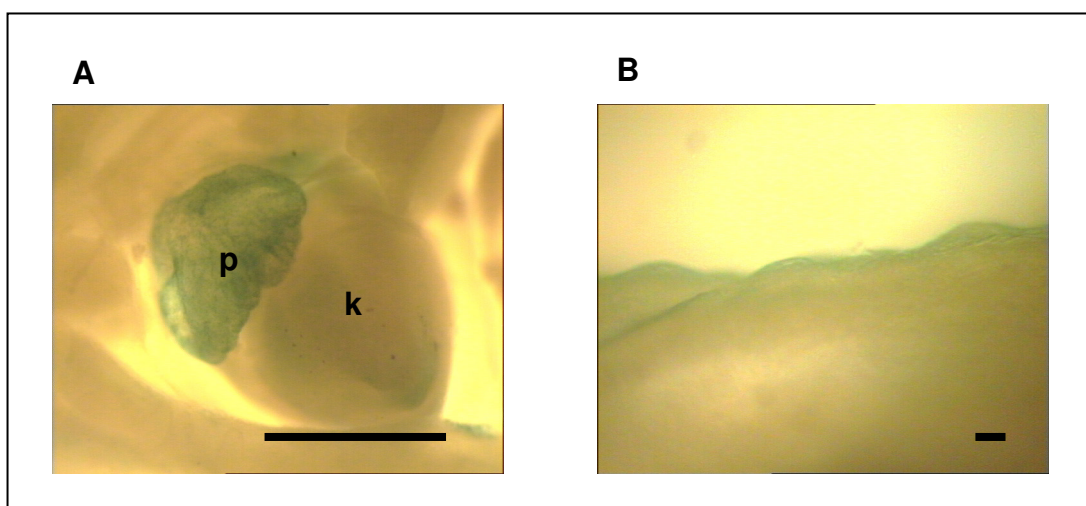
Kod zametaka starih 15,5 dana se, pored opisanog uzorka izražaja *Stam2* kod E14,5, pojavljuje i plavo-zelena obojenost kože koja će se zadržati do kraja gestacijskog razdoblja (slika 14 i 15). Izražaj *Stam2* u srcu intenzivniji je u području pretklijetke nego u području klijetke (slika 15A).

Tablica 8. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 15,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E15,5			
notokord	–	žlijezde slinovnice	–
kralježnična moždina (raphe)	+	jezik	–
kralježnična moždina (ploča dna)	+	ždrijelo	–
kralježnična moždina (bazalne ploče)	–	grlo	–
kralježnična moždina (krovna ploča)	+	jednjak	–
produžena moždina , most (raphe)	+	želudac	–
produžena moždina, most (ploča dna)	+	crijevo	–
mali mozak	–	štitnjača	–
telencefalon (intermedijarna zona)	–	pluća	–
telencefalon („subplate“ zona)	–	timus	–
telencefalon (kortikalna ploča)	–	jetra	–
hipokampus	–	gušterača	–
olfaktorni bulbus	–	bubreg	–
oko	–	nadbubrežna žlijezda	–
uho	–	testis	++
spinalni gangliji	–	jajnik	–
hipofiza	–	koža	+
srce	+	prednji udovi	–
usna šupljina	–	stražnji udovi	–



Slika 14. Sagitalni presjek kroz središnji živčani sustav zametka E15,5 divljeg tipa (**A**) i heterozigotnog zametka (**B**). **pd** – ploča dna, **ks** – koroidni splet. Crta mjerila - 1 mm.



Slika 15. **A.** β -galaktozidazna aktivnost u srcu heterozigotnog zametka E15,5. Intenzivnije su obojene pretklijetke budućeg srca. **B.** Površinska snimka kože heterozigotnog zametka E15,5. **p** – pretklijetka, **k** – klijetka. Crta mjerila u A - 1 mm; u B - 0,1 mm.

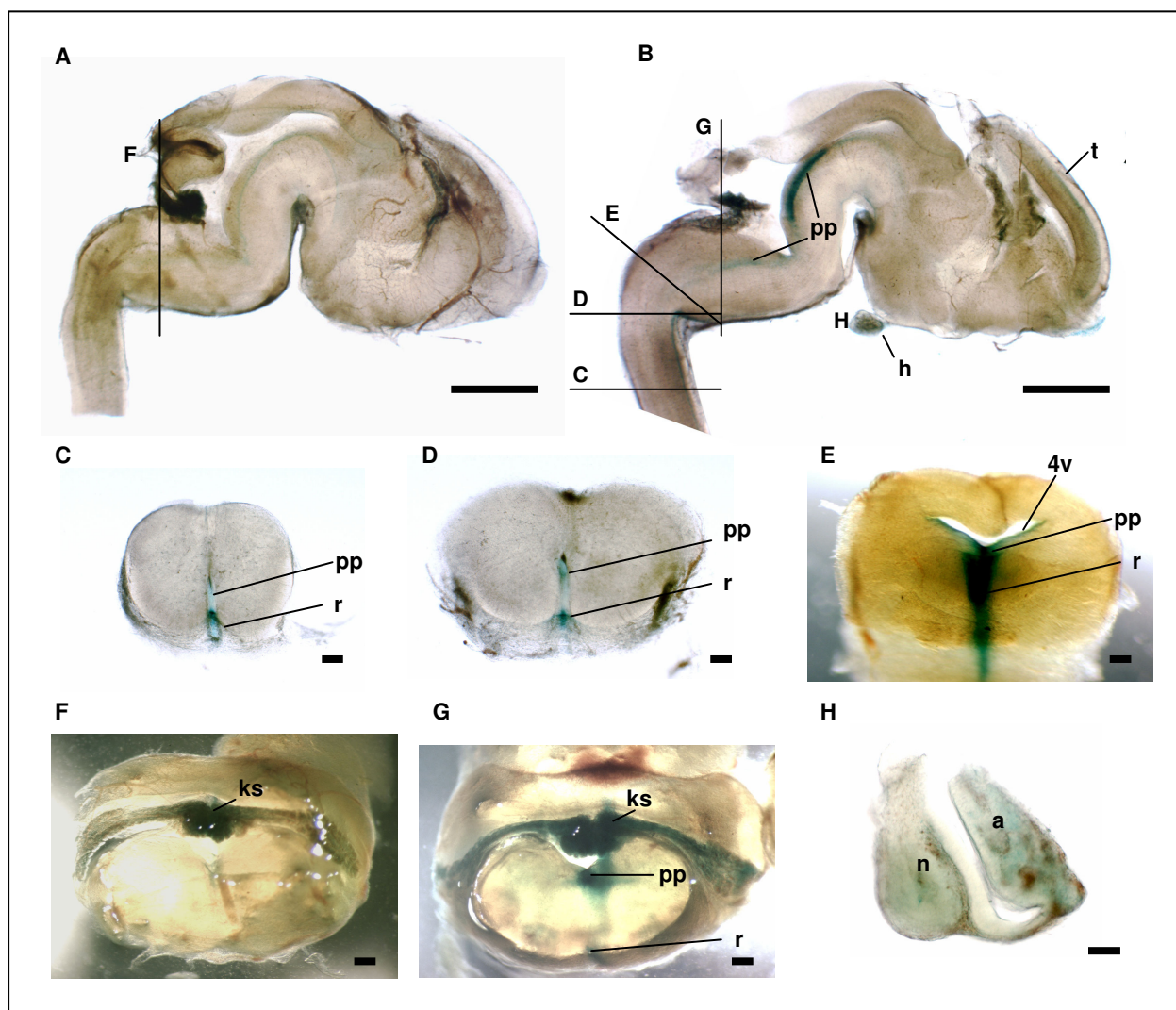
4.2.2.9. Zameci stari 16,5 dana (E16,5)

Središnji živčani sustav nastavlja intenzivan razvoj i na ovom stadiju pokazuje gotovo sve elemente prisutne i kod novorođenih miševa. Sa 16,5 dana pojavljuje se „subplate“ zona u kori velikog mozga, a postaje vidljiv i hipokampus. Ovo je razdoblje intenzivne diferencijacije nosnih školjki i vomeronazalnih organa. Već se jasno uočava olfaktorni živac koji povezuje olfaktorne režnjeve mozga sa strukturama u nosnoj šupljini. Zameci stari 16,5 dana u potpunosti su prekriveni kožom koja više strogo ne prati površinu tijela, već stvara kožne nabore.

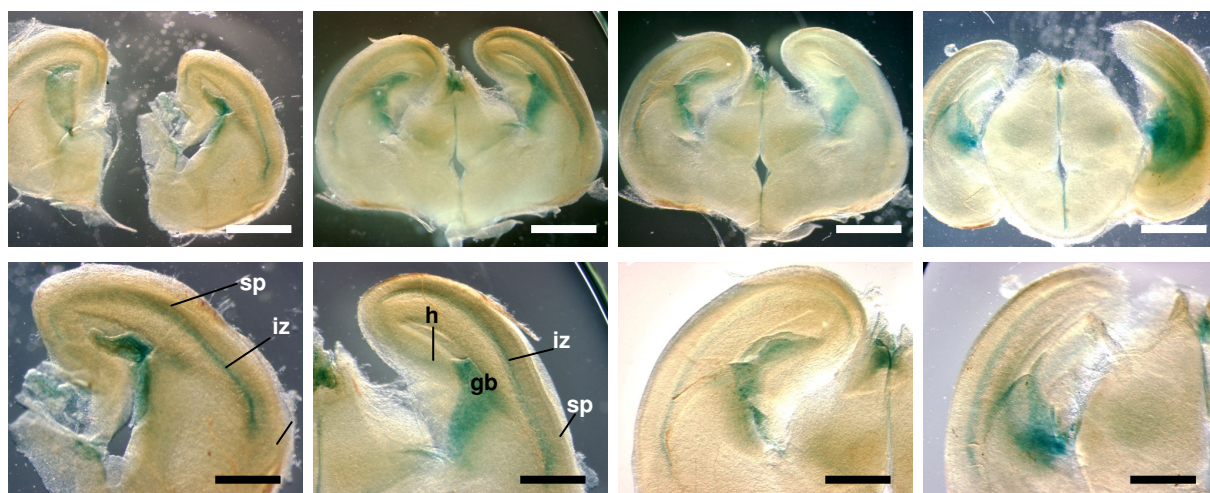
U ovom se stadiju razvitka aktivnost β -galaktozidaze iz kralježnične moždine i moždanog debla širi na telencefalon, hipokampus i olfaktorne bulbuse (slika 16). Pored toga njezina se aktivnost pojavljuje u hipofizi, te se pojačala u sjemenskim kanalićima testisa i koži. U području kralježnične moždine i moždanog debla *Stam2* je i dalje izražen u ploči dna i raphe, no njegova aktivnost nestaje u krovnoj ploči kralježnične moždine. Od ploče dna izražaj *Stam2* se proširio i na ventralni dio ventrikularnog sloja četvrte moždane komore (slika 16E). U telencefalonu je izražaj *Stam2* ograničen na područje intermedijarne zone i djelomično „subplate“ zone. Slabe naznake aktivnosti β -galaktozidaze vidljive su u hipokampusu i ganglijskom brežuljku (slika 17).

Tablica 10. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 16,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E16,5			
notokord	–	žlijezde slinovnice	–
kralježnična moždina (raphe)	+	jezik	–
kralježnična moždina (ploča dna)	+	ždrijelo	–
kralježnična moždina (bazalne ploče)	–	grlo	–
kralježnična moždina (krovnna ploča)	–	jednjak	–
produžena moždina , most (raphe)	+	želudac	–
produžena moždina, most (ploča dna)	+	crijevo	–
mali mozak	–	štitnjača	–
telencefalon (intermedijarna zona)	+	pluća	–
telencefalon („subplate“ zona)	+/-	timus	–
telencefalon (kortikalna ploča)	–	jetra	–
hipokampus	+/-	gušterača	–
ganglijski brežuljak	+/-	bubreg	–
olfaktorni bulbus	+	nadbubrežna žlijezda	–
oko	–	testis	+++
uho	–	jajnik	–
spinalni gangliji	–	koža	+
hipofiza	+	prednji udovi	–
srce	+	stražnji udovi	–
usna šupljina	–		



Slika 16. **A.** Sagitalni presjek kroz središnji živčani sustav zametka E16,5 divljeg tipa s označenim presjekom prikazanim u **F**. **B.** Sagitalni presjek kroz središnji živčani sustav heterozigotnog zametka s označenim presjecima prikazanim u **C**, **D**, **E** i **G**. **C**, **D**, **E** i **G**. Poprečni presjeci kroz kralježničku moždinu i moždano deblo heterozigotnog zametka. **F**. Poprečni presjek kroz moždano deblo zametka divljeg tipa. Vidljivo je plavo-zeleno obojenje koroidnog spleta što predstavlja pozadinsko obojenje i kod heterozigotnog zametka. **H.** Sagitalni presjek kroz hipofizu. β -galaktozidazna aktivnost prisutna je u prednjem i u stražnjem režnju buduće hipofize. **pd** – ploča dna, **r** – raphe, **4v** – ventrikularni sloj četvrte moždane komore, **ks** – koroidni splet, **nh** – neurohipofiza, **ah** – adenihipofiza. Crta mjerila u **A** i **B** – 1 mm; u **C**, **D**, **E**, **F** i **G** – 0,1 mm.



Slika 17. Serija frontalnih rezova kroz telencefalon heterozigotnog zametka E16,5 rostralno prema kaudalno. U drugom redu su povećane snimke detalja iz prvog reda. Vidljiva je β -galaktozidazna aktivnost u intermedijarnoj zoni i „subplate“ zoni telencefalona, te u hipokampusu i ganglijskom brežuljku. **iz** – intermedijarna zona, **sp** – „subplate“ zona, **h** – hipokampus, **gb** – ganglijski brežuljak. Crta mjerila u prvom redu - 1 mm; u drugom redu – 0,5 mm.

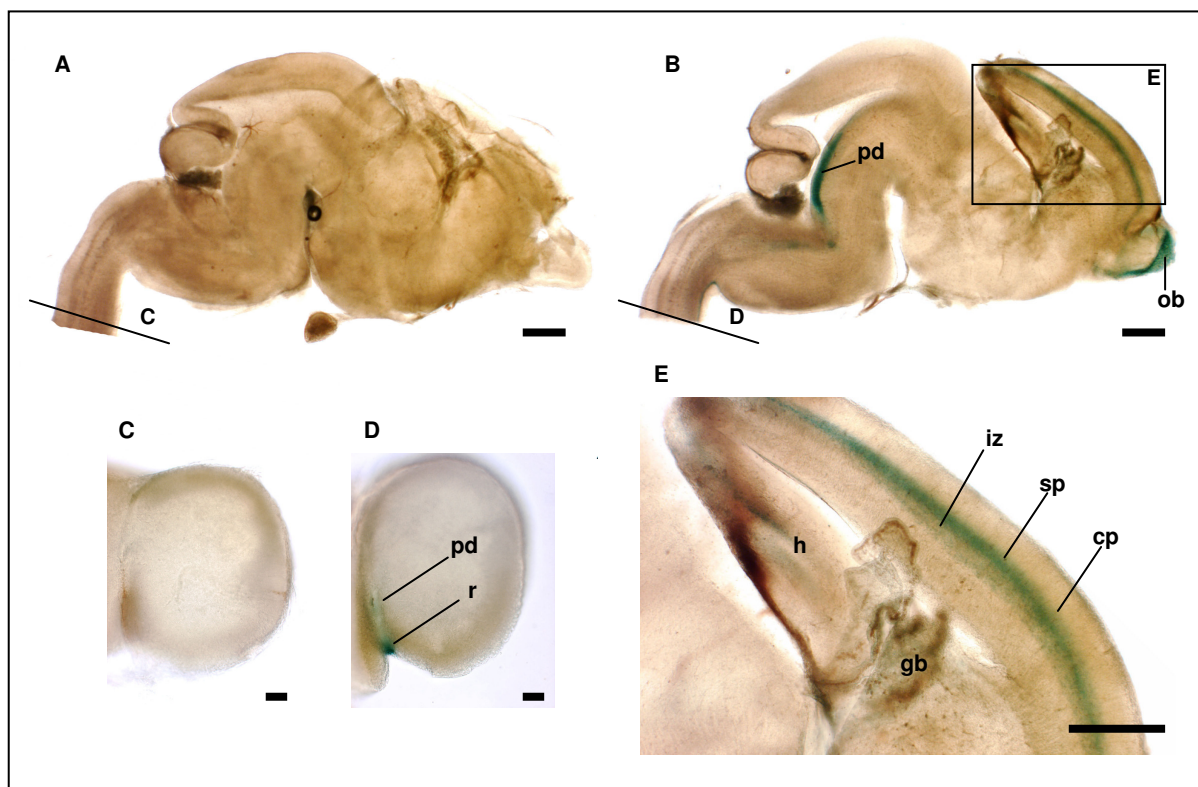
4.2.2.10. Zameci stari 17,5 dana (E17,5)

Svi organi zametaka starih 17,5 dana prolaze kroz završne procese diferencijacije, rasta i funkcionalnog sazrijevanja, te poprimaju oblik i veličinu odgovarajuću za novorođene miševe. U kori velikog mozga se odvija seljenje i diferencijacija stanica, a u skladu s time se reorganiziraju slojevi kore.

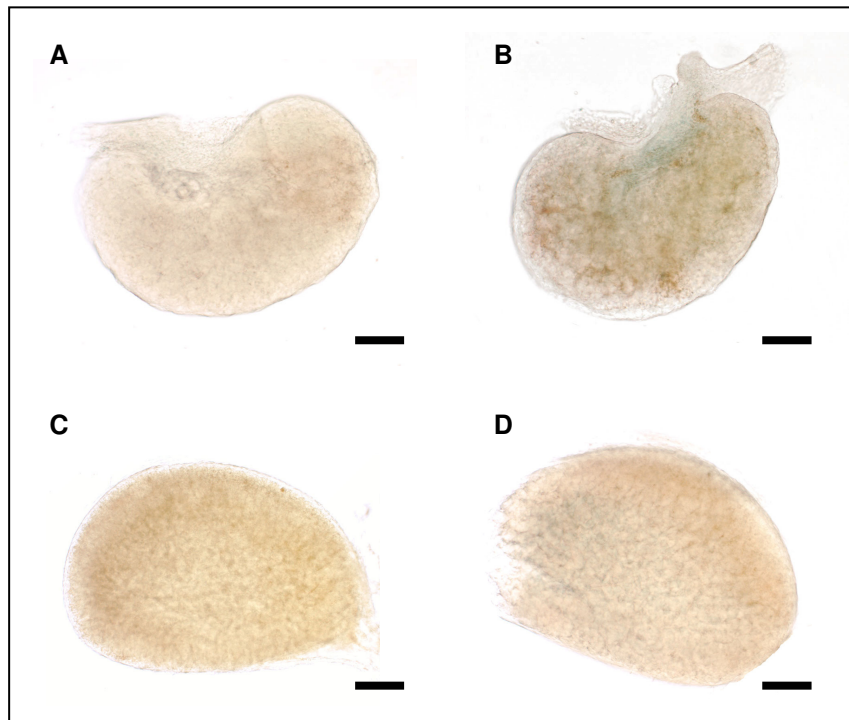
Aktivnost gena *Stam2* se u zametaka starih 17,5 dana iz „subplate“ zone širi na područje kortikalne ploče telencefalona (slika 18). S razvitkom hipokampusu, u njemu jača i izražaj *Stam2*. Izražaj u ganglijskom brežuljku slabi. Aktivnost β -galaktozidaze u ovom se stadiju pojavljuje i u jajnicima i nadbubrežnoj žlijezdi, te u epitelu jezika, a još je intenzivnija u koži, testisima i hipofizi (slika 19).

Tablica 11. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 17,5 dana.

Dan embrionalnog razvoja: E17,5			
notokord	–	žlijezde slinovnice	–
kralježnična moždina (raphe)	+	jezik (epitel)	+
kralježnična moždina (ploča dna)	+	ždrijelo	–
kralježnična moždina (bazalna ploče)	–	grlo	–
kralježnična moždina (krovnna ploča)	–	jednjak	–
produžena moždina , most (raphe)	+/-	želudac	–
produžena moždina, most (ploča dna)	+	crijevo	–
mali mozak	–	štitnjača	–
telencefalon (intermedijarna zona)	+	pluća	–
telencefalon („subplate“ zona)	+	timus	–
telencefalon (kortikalna ploča)	+/-	jetra	–
hipokampus	+	gušterača	–
ganglijski brežuljak	+/-	bubreg	–
olfaktorni bulbus	+	nadbubrežna žlijezda	+
oko	–	testis	+++
uho	–	jajnik	+
spinalni gangliji	–	koža	+
hipofiza	+	prednji udovi	–
srce	+	stražnji udovi	–
usna šupljina	–		



Slika 18. **A.** Sagitalni presjek kroz središnji živčani sustav zametka E17,5 divljeg tipa s označenim presjekom prikazanim u **C**. **B.** Sagitalni presjek kroz središnji živčani sustav heterozigotnog zametka s označenim presjekom prikazanim u **D**, te uokvirenim dijelom telencefalona i hipokampusa prikazanim u **E**. **C** i **D.** Poprečni presjeci kroz kralježničnu moždinu zametka divljeg tipa i heterozigotnog zametka. **E.** Sagitalni presjek kroz telencefalona i hipokampus heterozigotnog zametka. Vidi se izražaj *Stam2* u intermedijarnoj i „subplate“ zoni, te kortikalnoj ploči. **pd** – ploča dna, **ob** – olfaktorni bulbus, **r** – raphe, **iz** – intermedijarna zona, **sp** – „subplate“ zona, **cp** – kortikalna ploča, **h** – hipokampus, **gb** – ganglijski brežuljak. Crta mjerila u **A**, **B** i **E** - 1 mm; u **C** i **D** - 0,1 mm. Crta mjerila - 1 mm.



Slika 19. **A.** Presjek kroz jajnik zametka E17,5 divljeg tipa. **B.** Presjek kroz jajnik heterozigotnog zametka sa slabim izražajem *Stam2* u području srži jajnika. **C.** Presjek kroz nadbubrežnu žlijezdu zametka E17,5 divljeg tipa. **D.** Presjek kroz nadbubrežnu žlijezdu heterozigotnog zametka sa slabim izražajem *Stam2* u području srži. Crta mjerila – 0,1 mm.

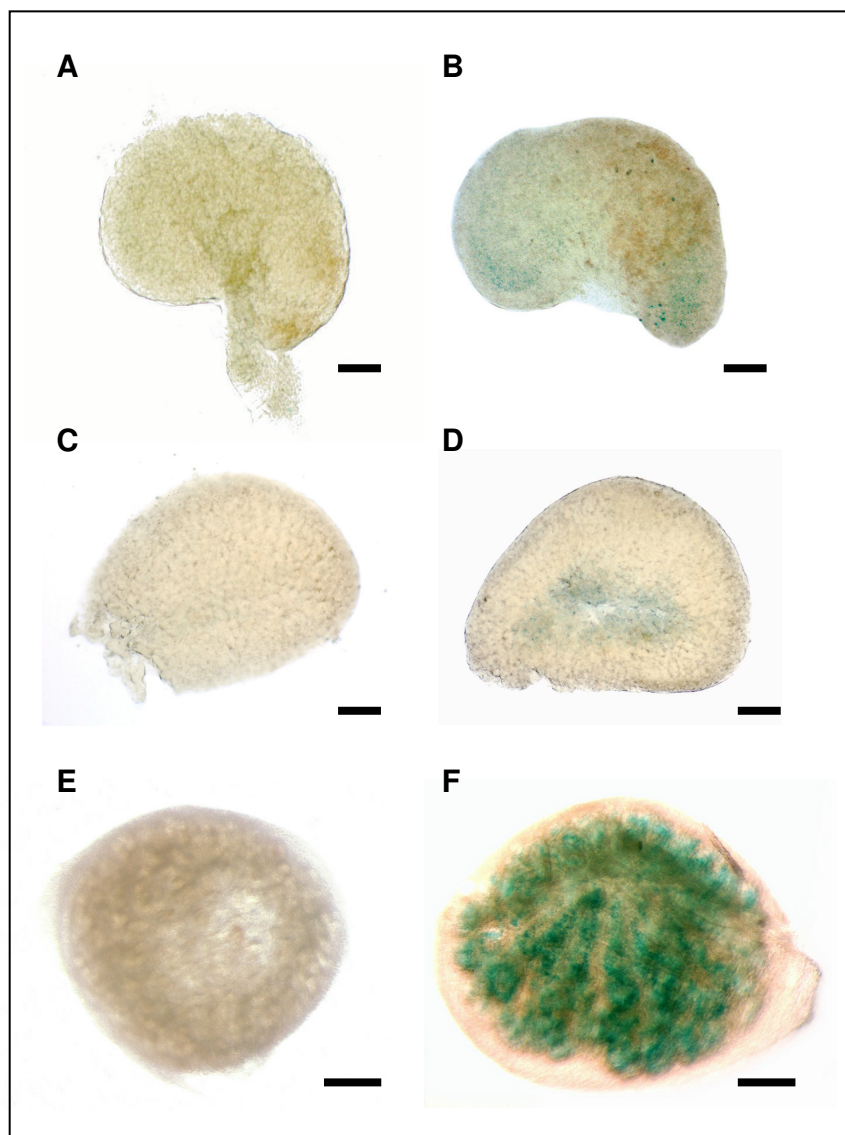
4.2.2.11. Zameci stari 18,5 dana (E18,5)

Zameci su na ovom stadiju već postigli razinu građevne i funkcionalne zrelosti potrebnu za preživljavanje izvan maternice i ne razlikuju se od novorođenih miševa, osim neznatno u veličini i debljini kože.

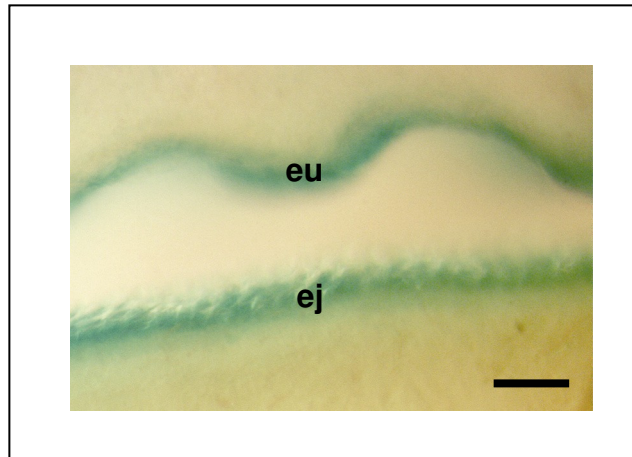
Posljednji dan gestacije slabi β -galaktozidazna aktivnost u ploči dna i potpuno nestaje u području raphe kralježnične moždine i moždanog debla, dok u ostalim dijelovima središnjeg živčanog sustava u kojima je prisutna kod E17,5, aktivnost β -galaktozidaze jača. Isto tako njena aktivnost jača u jajniku, testisu, nadbubrežnoj žlijezdi i hipofizi, a pored kože i epitela jezika, pojavljuje se i u epitelu sluznice usne šupljine (slike 20 i 21). β -galaktozidazna aktivnost jednako je kao i u stadijima prije prisutna u srcu, uz nešto jaču izraženost u području pretkljetki (slika 22).

Tablica 12. Izražaj gena *Stam2* u mišjih zametaka starih 18,5 dana.

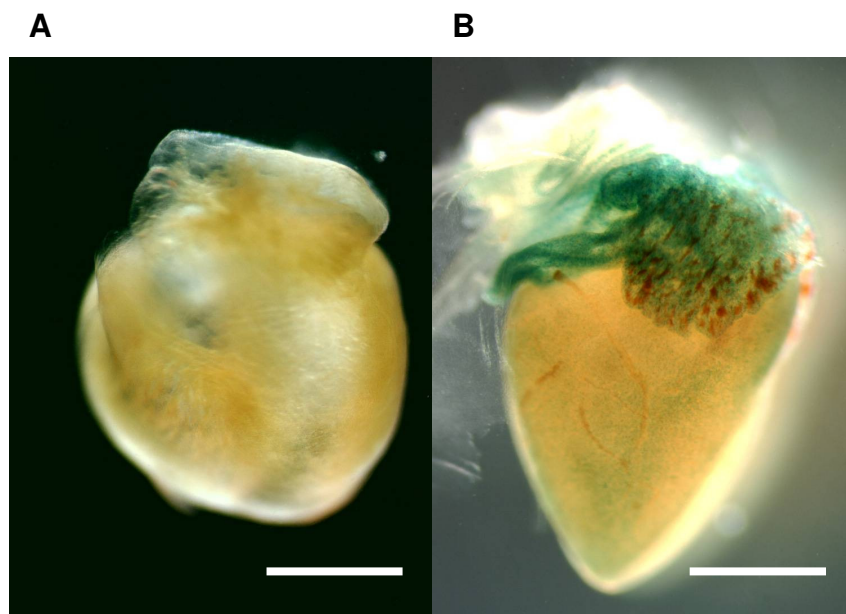
Dan embrionalnog razvoja: E18,5			
notokord	–	žlijezde slinovnice	–
kralježnična moždina (raphe)	–	jezik (epitel)	+
kralježnična moždina (ploča dna)	+/-	ždrijelo	–
kralježnična moždina (bazalne ploče)	–	grlo	–
kralježnična moždina (krovnna ploča)	–	jednjak	–
produžena moždina , most (raphe)	–	želudac	–
produžena moždina, most (ploča dna)	+/-	crijevo	–
mali mozak	–	štitnjača	–
telencefalon (intermedijarna zona)	+	pluća	–
telencefalon („subplate“ zona)	+	timus	–
telencefalon (kortikalna ploča)	++	jetra	–
hipokampus	+	gušterača	–
ganglijski brežuljak	+/-	bubreg	–
olfaktorni bulbus	+	nadbubrežna žlijezda	+
oko	–	testis	+++
uho	–	jajnik	+
Spinalni gangliji	–	koža	+
hipofiza	+	prednji udovi	–
srce	+	stražnji udovi	–
usna šupljina (epitel)	+		



Slika 20. **A.** Presjek kroz jajnik zametka E18,5 divljeg tipa. **B.** Presjek kroz jajnik heterozigotnog zametka s izraženom β -galaktozidaznom aktivnošću. **C.** Presjek kroz nadbubrežnu žlijezdu zametka E17,5 divljeg tipa. **D.** Presjek kroz nadbubrežnu žlijezdu heterozigotnog zametka s β -galaktozidaznom aktivnošću u području srži. **E.** Presjek kroz testis zametka E18,5 divljeg tipa. **F.** Presjek kroz testis heterozigotnog zametka s vrlo izraženom β -galaktozidaznom aktivnošću u sjemenskim mjehurićima. Crta mjerila – 0,1 mm.



Slika 21. Presjek kroz sluznicu usne šupljine i površinu jezika heterozigotnog zametka. **eu** – epitel usne šupljine, **ej** – epitel jezika. Crta mjerila – 0,1 mm.



Slika 22. **A.** Srce zametka E18,5 divljeg tipa. **B.** Srce heterozigotnog zametka s intenzivnijom β -galaktozidaznom aktivnošću u području pretkljetki. Crta mjerila – 1 mm.

4.2.2.12. Pregled izražaja *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja

Izražaj gena *Stam2* pojavljuje se prvo na stadiju E9,5 u primitivnom crijevu. Kod zametaka E10,5 nestaje izražaj u crijevu, a pojavljuje se u osnovi srca gdje će se zadržati do kraja trudnoće. Pored izražaja u srcu kod zametaka E11,5 pojavljuje se izražaj u notokordu i neuralnoj cijevi, ograničen na područja ploče dna i bazalnih ploča. Izražaj u neuralnoj cijevi se nastavlja kroz sve kasnije razvojne stadije, s određenim promjenama u rasporedu izražaja, što se kasnije odnosi na kralježničnu moždinu, produženu moždinu i pons. Izražaj *Stam2* u bazalnim pločama gubi se sa 13,5 dana starosti zametaka, dok se u ploči dna zadržava do kraja trudnoće (u kralježničnoj moždini, produženoj moždini i ponsu). Kod E12,5 pojavljuje se izražaj u krovnoj ploči kralježnične moždine i zadržava se do E15,5. U području raphe kralježnične moždine pojavljuje se izražaj sa 13,5 dana starosti zametka, te se sljedeći dan proširi i na područje raphe produžene moždine i ponsa. Izražaj u području raphe oslabi oko 17. dana razvitka.

U području velikog mozga izražaj *Stam2* se pojavljuje sa 16,5 dana starosti zametka u kori velikog mozga, hipokampusu, olfaktornim bulbusima i u manjoj mjeri u ganglijskom brežuljku gdje se zadržava do kraja trudnoće. Unutar kore velikog mozga izražaj *Stam2* se širi iz intermedijarne zone, preko „subplate“ zone do kortikalne ploče u skladu s kronologijom razvitka tih slojeva, tako da se u kortikalnoj ploči pojavljuje sa 17,5 dana starosti zametka.

Izražaj *Stam2* vrlo je uočljiv u testisima gdje je prisutan od E13,5 do kraja trudnoće. Izražaj u koži se pojavljuje kod E15,5 i ostaje do kraja trudnoće, dok se u jajnicima, nadbubrežnoj žlijezdi, hipofizi, te pokrovnom epitelu jezika i usne šupljine pojavljuje dan ili dva prije okota.

Pored navedenih tkiva i organa gdje je primijećena aktivnost β -galaktozidaze, ispitani su i organi koji nisu pokazali nikakvu aktivnost β -galaktozidaze: mali mozak, spinalni gangliji, zubi, žlijezde slinovnice, ždrijelo, jednjak, gušterača, jetra, štitnjača, grlo, dušnik, bronhi, pluća, bubrezi, mokraćni mjehur, oko, pužnica, folikuli brkova, timus te prednji i stražnji udovi zametaka. Pozitivnu reakciju na bojanje su pokazali koroidni splet, želudac i crijevo heterozigotnih zametaka, ali i zametaka divljeg tipa, što znači da se radi o pozadinskom bojanju, a ne aktivnosti gena *Stam2*.

Dinamika prisutnosti (+) i odsutnosti (–) izražaja gena *Stam2* u pojedinim organima i organskim sustavima tijekom embrionalnog razvoja miša prikazana je u tablici 13. Prazna područja (bez znakova + ili –) predstavljaju vrijeme prije pojave, odnosno poslije nestanka pojedinih organa, dok u području crijeva nakon 13. dana razvitka predstavljaju prisutnost pozadinskog bojanja.

Tablica 13. Rasprostranjenost izražaja gena *Stam2*.

Dan embrionalnog razvoja	E8,5	E9,5	E10,5	E11,5	E12,5	E13,5	E14,5	E15,5	E16,5	E17,5	E18,5
notokord				+							
Živčani sustav											
kralježnična moždina (raphe)					–	+	+	+	+	+	–
kralježnična moždina (ploča dna)		–	–	+	+	+	+	+	+	+	+/-
kralježnična moždina (bazalne ploče)			–	+	+/-	–					
kralježnična moždina (krovnna ploča)		–	–	–	+	+	+	+	–	–	
produžena moždina, most (raphe)					–	–	+	+	+	+/-	–
produžena moždina, most (ploča dna)					–	+	+	+	+	+	+/-
telencefalon (intermedijarna zona)								–	+	+	+
telencefalon („subplate“ zona)								–	+/-	+	+
telencefalon (kortikalna ploča)									–	+/-	++
hipokampus								–	+/-	+	+
ganglijski brežuljak									+/-	+/-	+/-
olfaktorni bulbus								–	+	+	+
Srce		–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Probavni sustav											
crijevo	–	+	–	–	–	–					
epitel usne šupljine									–	–	+
epitel jezika									–	+	+
Endokrini sustav											
hipofiza								–	+	+	+
nadbubrežna žlijezda								–	–	+	+
testis						+	+	++	+++	+++	+++
jajnik									–	+	+
Koža								+	+	+	+

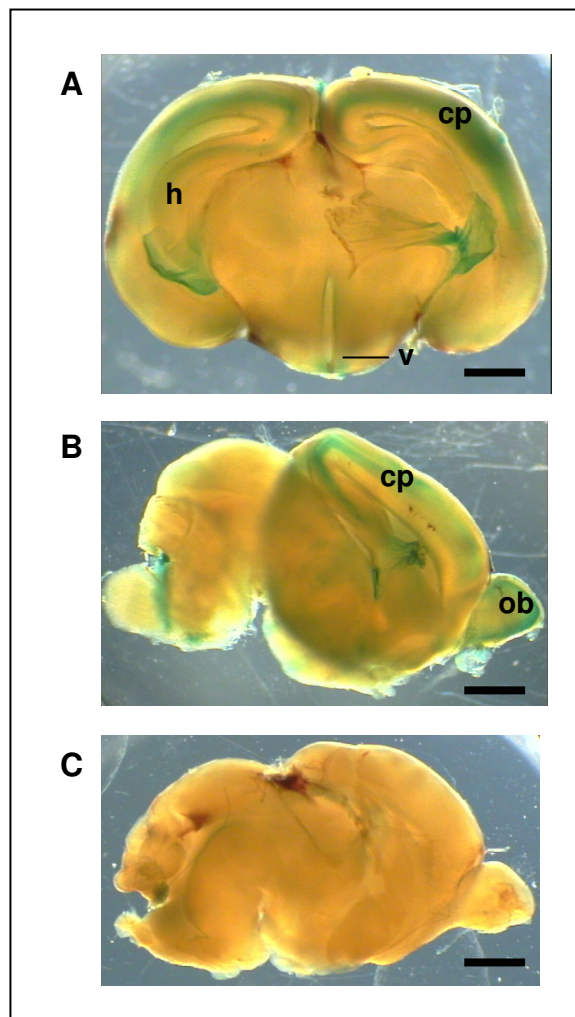
4.2.3. Izražaj *Stam2* u mozgu novorođenih i odraslih miševa postupkom histokemijskog bojanja na enzim β -galaktozidazu.

Kako bi se omogućilo usmjereno istraživanje uloge gena *Stam2* u središnjem živčanom sustavu, te povezivanje njegove uloge u razvoju tog sustava s ulogom u funkcioniranju živčanog sustava odraslih životinja, pored opisanog izražaja tog gena tijekom razvitka, učinjena je analiza aktivnosti β -galaktozidaze u mozgu novorođenih miševa, te u mozgu odraslih miševa.

4.2.3.1. Mozak novorođenog miša (P0)

Analiza aktivnosti β -galaktozidaze učinjena je na 1 mm debelim frontalnim i sagitalnim rezovima mozga novorođenih heterozigotnih potomaka heterozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2* i miševa divljeg tipa, dok su kontrolnu skupinu predstavljali novorođeni miševi divljeg tipa iz istog legla.

Rezultati ove analize su pokazali da je izražaj gena *Stam2* prisutan u drugom, trećem i petom sloju kortikalne ploče velikog mozga (slika 23). Izražaj *Stam2* pokazuju hipokampus i olfaktorni bulbusi novorođenih miševa, te u vrlo malom intenzitetu ventralni dio periakveduktalne sive tvari, ganglijski brežuljak i putamen (slika 23 B).



Slika 23. **A.** Frontalni presjek kroz mozak novorođenog miša, heterozigotnog nosioca preinake u *Stam2*. **B.** Sagitalni presjek kroz desnu polutku mozga novorođenog miša, heterozigotnog nosioca preinake u *Stam2*. **C.** Sagitalni presjek kroz lijevu polutku mozga novorođenog miša divljeg tipa. **cp** – kortikalna ploča, **h** – hipokampus, **v** – ventralni dio periakveduktalne sive tvari, **ob** – olfaktorni bulbus. Crta mjerila - 1 mm.

4.2.3.2. Mozak odraslog miša

Analiza izražaja gena *Stam2* učinjena je na 300 µm debelim horizontalnim, frontalnim i sagitalnim rezovima mozga homozigotnih nosilaca preinake u genu *Stam2*, te miševa divljeg tipa.

Aktivnost β-galaktozidaze je na rezovima mozga odraslog miša uočljivija u području kore velikog mozga, te u području hipokampusa (slika 24A). U kori velikog mozga, intenzivan je izražaj *Stam2* u drugom i trećem sloju, zatim u petom i šestom sloju, a slabiji je u četvrtom sloju (slika 24D). U prvom sloju aktivnost β-galaktozidaze nije primijećena. Unutar hipokampusa, aktivnost β-galaktozidaze je najintenzivnija u piramidnom sloju područja CA1, CA2 i CA3, te nešto slabije u sloju zrnatih stanica gyrusa dentatusa.

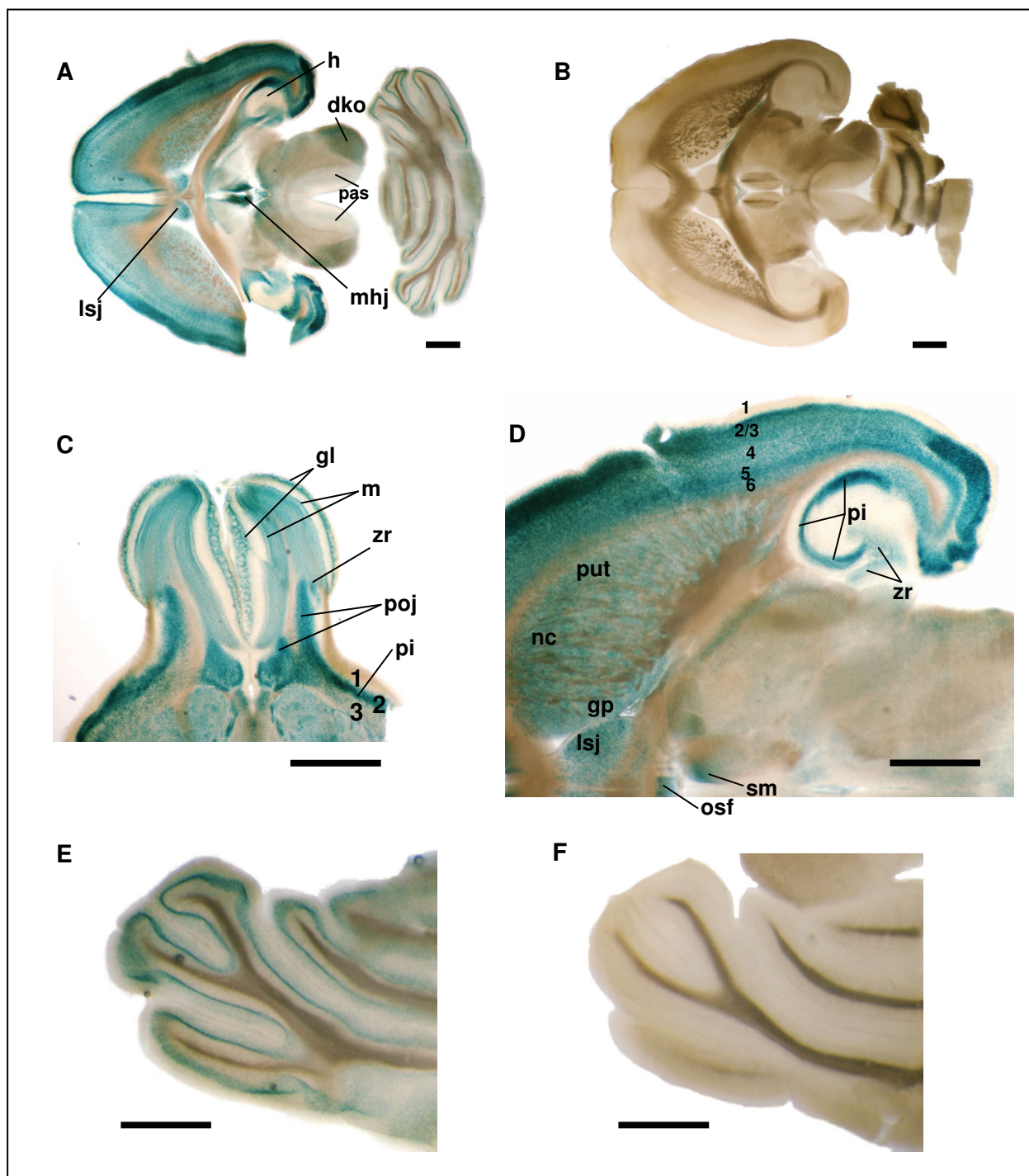
Stam2 je izražen i u olfaktornim bulbusima gdje je ograničen na područje glomerularnog sloja, sloja mitralnih stanica, sloja zrnatih stanica, te lateralno i medijalno područje prednje olfaktorne jezgre (slika 24C). Aktivnost β-galaktozidaze vidljiva je u području bazalnih ganglija (nucleus caudatus, putamen i globus pallidus), a odsutna je u vlaknima bijele tvari koja kroz njih prolaze na putu iz unutrašnje u vanjsku čahuru (slika 24D). Njena je aktivnost prisutna u amigdaloidnom tijelu (bazalna i lateralna amigdaloidna jezgra).

Aktivnost β-galaktozidaze pokazuju lateralna septalna jezgra, organum subfornicale, stria medularis (thalamus) i medijalna habenularna jezgra epitalamusa (slika 24A i D). U području ponsa *Stam2* je izražen u ventralnoj slušnoj jezgri (lateralno), jezgrama ponsa (koje nastaju iz dorzalnog dijela neuralne cijevi), donjem kolikulu (ventralno) i vrlo slabo u periakveduktalnoj sivoj tvari (ventralno).

Stam2 je izražen i u kori malog mozga u području koji odgovara sloju Purkinjeovih stanica (slika 24E).

Tablica 14. Područja izražaja gena *Stam2* u mozgu odraslog miša

Područje	Strukture u kojima je prisutan izražaj <i>Stam2</i>	Kratice
Olfaktorni bulbus	glomerularni sloj sloj mitralnih stanica sloj zrnatih stanica prednja olfaktorna jezgra	gl mi zr poj
Kora velikog mozga	2. i 3. sloj – intenzivno po cijeloj površini 4. sloj slabije 5. i 6. sloj jače od 4	2 i 3 4 5 i 6
Hipokampus	piramidni sloj (CA1, CA2, CA3) sloj zrnatih stanica (girus dentatus)	pi zr
Bazalni gangliji (vlakna koja prolaze kroz njih iz unutrašnju u vanjsku kapsulu nisu pozitivna)	nucleus caudatus putamen globus pallidus	nc put gp
Amigdala	bazalna amigdaloidna jezgra lateralna amigdaloidna jezgra	
Medijalne strukture	lateralna septalna jezgra organum subfornicale stria medularis (talamus) medijalna habenularna jezgra epitalamusa	lsj osf sm mhj
Pons	ventralna slušna jezgra (lateralno) jezgre ponsa donji kolikul (ventralno) periakveduktalna siva tvar (ventralno)	dko past
Mali mozak	sloj Purkinjeovih stanica	



Slika 24. Izražaj gena *Stam2* u mozgu odraslog miša. **A.** Horizontalni presjek kroz veliki i mali mozak homozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2*. **B.** Horizontalni presjek kroz veliki i mali mozak miša divljeg tipa. **C.** Horizontalni presjek kroz olfaktorni bulbus homozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2*. **D.** Horizontalni presjek dijela velikog mozga homozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2*. **E.** Horizontalni presjek kroz mali mozak homozigotnog nosioca preinake u genu *Stam2*. **F.** Horizontalni presjek kroz mali mozak miša divljeg tipa. **h** - hipokampus, **dko** - donji kolikul, **pas** - periaqueduktalna siva tvar, **lsj** - lateralna septalna jezgra, **mhj** - medijalna habenularna jezgra epitalamusa, **gl** - glomerularni sloj, **mi** - sloj mitralnih stanica, **zr** - sloj zrnatih stanica, **poj** - prednja olfaktorna jezgra, **pir** - piriformni korteks, **put** - putamen, **nc** - nucleus caudatus, **gp** - globus pallidus, **pi** - piramidni sloj, **osf** - organum subfornicale, **sm** - stria medularis, **1 – 6** - slojevi kore velikog mozga. Crta mjerila – 1 mm.

5. RASPRAVA

5.1. Transgenična mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} - model za istraživanje izražaja gena *Stam2*

5.1.1. Genska zamka kao postupak za istraživanje izražaja i uloge gena

U ovom radu istraživao je izražaj mišjeg gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja i u središnjem živčanom sustavu odraslog miša. Istraživanje je provedeno na modelu transgenične mišje linije *Stam2*^{Gt1Gaj} dobivene postupkom genske zamke. Ugrađeni gen biljeg, *lacZ*, čija aktivnost oslikava aktivnost gena *Stam2*, omogućio je brzo i jednostavno otkrivanje aktivnosti gena *Stam2*.

Transgenične mišje linije dobivene postupkom ciljane preinake gena, tzv. „knock-out“ linije, također imaju ugrađeni gen biljeg. Štoviše, takvi su miševi pogodniji za kasnije istraživanje promjene fenotipa jer je preinaka ciljanog gena potpuna, tj. ne stvara se odgovarajuća RNA ni bjelančevina. U većini slučajeva ključni dijelovi ciljanog gena izbrisani su iz same genomske DNA, pa ne postoji mogućnost njihove djelomične ili potpune ponovne aktivacije (61). Rezultati molekularne analize ugradnje vektora genske zamke u gen *Stam2* pokazali su da je kod transgeničnih miševa dobivenih postupkom genske zamke moguća takva djelomična aktivacija preinačenog gena. To se događa zbog toga što stanični mehanizam za prekrajanje heteronuklearne RNA ne prepoznaje uvijek primač prekrajanja koji se nalazi na početku vektora genske zamke, te vektor genske zamke ne postaje dio konačnog transkripta (77). S druge strane, zbog nasumične ugradnje vektora genske zamke u genom postupak genske zamke onemogućuje samo dio gena koji se nalazi nizvodno od mjesta ugradnje vektora. Ovi nedostaci postupka genske zamke svakako ga čine manje privlačnim od postupka ciljane preinake gena za istraživanje uloge preinačenog gena *in vivo* proučavanjem promjene fenotipa transgeničnih miševa.

Međutim, primjena postupka genske zamke u svrhu istraživanja izražaja gena na razini tkiva i organa, te za pronalaženje novih gena sa specifičnim izražajem (npr. tijekom embrionalnog razvoja) primjerenija je od postupka ciljane preinake gena. Prednost postupka genske zamke pred ciljanom promjenom gena dolazi posebno do izražaja kod istraživanja većeg broja gena obzirom da je kod ciljane promjene gena potrebno izraditi poseban vektor za svaki gen, dok se

vektor genske zamke može primijeniti za preinaku većeg broja gena, što značajno smanjuje troškove pokusa.

5.1.2. Ugrađeni vektor genske zamke omogućuje praćenje izražaja preinačenog gena *Stam2*

Kako bi se mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} mogla upotrijebiti za praćenje izražaja gena *Stam2* bilo je potrebno provjeriti je li vektor genske zamke s genom biljegom *lacZ* ugrađen u gen *Stam2*, je li ga stanica prihvatila i ugradila u promijenjeni transkript gena *Stam2*, te nastaje li iz takvog transkripta bjelančevina s β -galaktozidaznom aktivnošću.

Rezultati ovog rada pokazali su da je vektor genske zamke ugrađen unutar introna između drugog i trećeg egzona gena *Stam2* (slika 5A). To je u skladu s rezultatima drugih autora koji su pokazali da je vjerojatnost ugradnje vektora genske zamke u intron veća nego u egzon (65, 66, 78).

Budući da je vektor genske zamke ugrađen u početni dio gena *Stam2*, samo se prvi dio gena prije mjesta ugradnje vektora prepisuje u 226 baza dugački dio mRNA. Ostatak gena, koji bi nakon prepisivanja predstavljao veći dio transkripta od 1593 baza, ne prepisuje se zbog poliA signala na kraju vektora. Zbog toga postoji vjerojatnost da je ovako preinačen gen *Stam2* nedjelotvoran.

Postupak „northern blot“ s probom specifičnom za vektor genske zamke dokazao je da je stanica prihvatila ugrađeni vektor kao dodatni egzon, te je nastao stopljeni transkript koji se sastoji od 226 baza dugačkog 5' dijela transkripta gena *Stam2* i od transkripta vektorskog gena *β geo*.

Stvaranje stopljene bjelančevine s aktivnošću β -galaktozidaze pod kontrolom promotora uhvaćenog gena dokazano je promjenom boje supstrata X-gal u plavo na tkivima i organima miševa transgenične mišje linije *Stam2*^{Gt1Gaj}. Time je pokazano da prisutnost malenog dijela bjelančevine STAM2 na N- kraju stopljene bjelančevine nije onemogućio enzimsku aktivnost β -galaktozidaze, kao i da je ovaj model prikladan za proučavanje izražaja gena *Stam2* dodavanjem supstrata za β -galaktozidazu. Međutim, postoji određena vjerojatnost da aktivnost β -galaktozidaze ne odražava u potpunosti aktivnost uhvaćenog gena, jer ugradnja vektora u mišji genom može poremetiti regulaciju transkripcije uhvaćenog gena (79). Jedna od mogućnosti za potvrdu izražaja prikazanog bojanjem na β -galaktozidazu je *in situ* hibridizacija. Međutim tim postupkom se u stanici prati prisutnost mRNA istraživanog gena, dok bojanje na β -galaktozidazu pokazuje prisutnost odgovarajuće bjelančevine. Budući da nije nužno da se od glasničke RNA

uvijek stvori bjelančevina, područje izražaja na razini bjelančevina može biti predstavljati samo dio područja izražaja pokazanog na razini RNA.

Pretpostavlja se da stopljena bjelančevina ne izlazi iz stanice u kojoj je nastala, jer ne posjeduje signalni slijed za izlučivanje izvan stanice. Stoga se ovaj model miša smatra pogodnim za istraživanje izražaja *Stam2* na razini tkiva. S obzirom na mogućnost da zbog nedostatka ključnih domena bjelančevine STAM2, stopljena bjelančevina neće zauzeti prirodni smještaj bjelančevine STAM2 unutar stanice, na ovom modelu nije istraživani unutarstanični smještaj bjelančevine STAM2. Štoviše, moguće je da bi stanice u kojima je izražen preinačeni gen *Stam2* mogle imati poremećeni raspored organela, prvenstveno endosoma, na što upućuje otkriće da u slučaju nemogućnosti vezanja STAM2 za HRS dolazi do povećanja ranih endosoma, te nakupljanja ubikvitiniranih bjelančevina u tim organelama (42).

Budući da je cilj ovog rada bio dobiti sliku prostorne i vremenske rasprostranjenosti izražaja gena *Stam2* u tkivima i organima mišjih zametaka i odraslih miševa, činjenica da mišja linija *Stam2^{Gt1Gaj}* posjeduje učinkovitu preinaku u genu *Stam2* koja omogućuje jednostavno praćenje njegovog izražaja praćenjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze čini liniju *Stam2^{Gt1Gaj}* dobrim modelom za ovo istraživanje.

5.1.3. Alternativno prekrajanje transkripta gena *Stam2*

Alternativno prekrajanje je raširena pojava u genomu sisavaca. Više od 60% svih gena čovjeka ima alternativno prekrojene inačice (80). Smatra se da alternativno prekrajanje ima glavnu ulogu u evoluciji genoma i stvaranju raznovrsnosti bjelančevina na samo time što uzrokuje stvaranje novih oblika funkcionalnih bjelančevina već i utjecajem na regulaciju djelovanja bjelančevina, primjerice uklanjanjem domena ključnih za specifično djelovanje ili smještaj unutar stanice (81). Isto tako alternativno prekrajanje može regulirati izražaj gena prekrajanjem transkripata gena u nekorisne mRNA koje će se brzo razgraditi (81).

Alternativni egzon 1A nađen u genu *Stam2* odgovara dijelu introna koji je prilikom prekrajanja zadržan u mRNA kao egzon. Takvo izdvajanje intronskih sljedova da bi postali novi egzoni predstavlja model evolucijskog stvaranja novih dijelova bjelančevina kod eukariota (82 – 84). Usporedba mišjeg genoma s genomima ostalih eukariota pokazala je da se egzon 1A ne pojavljuje ni u kojem drugom genomu osim mišjem, u kojem se pojavljuje samo unutar gena *Stam2* (76). Slično kao kod egzona 1A, egzoni koji se pojavljuju samo u alternativno prekrajenim transkriptima sa slabijim izražajem (za razliku od normalno prekrajenih, takozvanih

glavnih oblika transkripata) nisu evolucijski očuvani i smatraju se rezultatom nedavnih evolucijskih događaja (84).

Alternativni egzon 1A nalazi se unutar prvog introna gena *Stam2* (slika 7A), a analiza sljeda nukleotida tog egzona pokazala je prisutnost stop kodona UAA u aktivnom okviru čitanja (76). Premda je mala vjerojatnost da će se u procesu prevođenja RNA u bjelančevinu preskočiti taj stop kodon i normalno nastaviti prevođenje (engl. *readthrough*), postoji mogućnost da će na taj način nastati funkcionalna bjelačevina STAM2 (85). U tom bi slučaju zbog umetnutog egzona 1A bila poremećena građa, a time i funkcija domene VHS, a ostale bi domene bjelančevine STAM2 bile sačuvane. Rezultati hibridizacije „western blot“ su pokazali da u organima u kojima se pojavljuje alternativni transkript (mozak i testis) ne nastaje drugi oblik bjelančevine STAM2 osim normalne bjelančevine STAM2 (slika 6C).

Budući da je egzon 1A smješten na samom početku gena *Stam2*, te da posjeduje stop kodon, pretpostavlja se da nije očuvana niti jedna funkcionalna domena bjelančevine STAM2. Rezultat ovakvog alternativnog prekrajanja mRNA gena *Stam2* je polipeptid sastavljen od 61 aminokiseline koje predstavljaju 1,5 % bjelančevine STAM2. Malo je vjerojatno da će takav polipeptid zadržati išta od funkcije bjelančevine STAM2. Budući da je u svim ispitivanim organima bio prisutan normalan oblik transkripta gena *Stam2*, te prisutnost alternativno prekrojenog transkripta u određenim organima (slika 7B) u tim organima nije poremetila stvaranje normalne bjelančevine STAM2 (slika 6C), izgleda da alternativno prekrajanje gena *Stam2* nema nikakvih funkcionalnih posljedica. Međutim, postoje primjeri gdje su nefunkcionalni i nekonzervirani alternativno izrezani egzoni odigrali važnu ulogu. Točkasta preinaka u elementu *Alu* smještenom unutar trećeg introna gena za ornitin aminotransferazu potaknula je skriveno mjesto prekrajanja što je premjestilo element *Alu* u aktivni okvir čitanja (86). U tom okviru čitanja se unutar elementa *Alu* nalazio stop kodon koji je uzrokovao stvaranje nepotpune bjelančevine i manjak normalne ornitin aminotransferaze. Ovo je primjer nastajanja promjene u izražaju gena te se pretpostavlja da sličnim mehanizmom nastaju brze evolucijske promjene čime se povećava raznovrsnost bjelančevina (87). Stvaranje alternativno prekrojenog transkripta gena *Stam2* isto tako predstavlja mogućnost kojom bi stanica regulirala izražaj gena *Stam2* ovisno o udjelu alternativnog transkripta u stanici.

5.2. Izražaj gena *Stam2*

5.2.1. Izražaj *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja

Analiza izražaja gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja pokazala je da se izražaj *Stam2* prvo nakratko pojavljuje u stražnjem primitivnom crijevu zametka, a zatim srcu i središnjem živčanom sustavu zametaka gdje ostaje izražen do kraja embrionalnog razvoja. Pred kraj gestacijskog razdoblja pojavljuje se izražaj tog gena i u endokrinom sustavu (spolne žlijezde, nadbubrežna žlijezda, hipofiza) i pokrovnom epitelu (koža, sluznica usne šupljine i jezika).

Obzirom da je bjelančevina STAM2 po svojoj građi i ulozi vrlo slična bjelančevini STAM1, a njena je uloga strogo povezana s ulogom bjelančevine HRS, zanimljivo je usporediti izražaj gena *Stam2* s izražajem gena *Stam1* i *Hrs*. *Hrs* je ubikvitarno izražen tijekom razvitka između 13. i 18. dana razvoja, premda je njegov izražaj najintenzivniji u središnjem živčanom sustavu mišjeg zametka (88). *Stam1* je kod 18 dana starih zametaka izražen u mozgu, kralježničnoj moždini, spinalnim ganglijima, timusu, srcu, plućima, jetri, bubrezima, crijevu i smeđem masnom tkivu (89). Ovakav ubikvitaran izražaj može se objasniti pretpostavkom da molekule STAM1, STAM2 i HRS sudjeluju u redovitim aktivnostima koje provode stanice svih tkiva, pa je stoga svugdje prisutan njihov izražaj. Na isti način mogao bi se objasniti sveprisutan izražaj *Stam2* i u organima odraslih miševa. Analiza rasprostranjenosti mRNA *Stam2* pokazala je da je *Stam2* kod odraslih miševa izražen u svim ispitivanim tkivima i organima. To je u skladu s rezultatima drugih autora koji su do istih rezultata došli postupkom northern blot s RNA odraslih miševa (36).

5.2.2. Izražaj *Stam2* u središnjem živčanom sustavu

Izražaj *Stam2* u središnjem živčanom sustavu mišjih zametaka i odraslih miševa usporediv je s izražajem molekula STAM1 i HRS u mozgu tijekom razvitka i kod odraslih miševa (88, 89). Izražaj gena *Hrs* prisutan je u središnjem živčanom sustavu odraslog miša, posebno u olfaktornim bulbusima, piriformnom korteksu, hipokampusu, jezgrama ponsa i malom mozgu (88). U svim navedenim strukturama izražaja gena *Hrs* pojavljuje se izražaj gena *Stam2*, što je u skladu s pretpostavljenom povezanošću uloga tih dviju molekula (45). Ne postoji sustavna analiza izražaja gena *Stam1* u mozgu odraslog miša, no transgenični miševi s onemogućenim genom *Stam1* pokazali su nedostatak piramidnih neurona u području CA3 hipokampusa odraslog

mozga, pa se pretpostavlja da je izražaj gena *Stam1* važan za te stanice (89). Budući da se smatra da molekule STAM1 i STAM2 imaju slične uloge, izražaj *Stam2* u piramidnom sloju hipokampusa doprinos je toj teoriji (38).

5.2.3. Izražaj i uloga gena *Stam2*

Analizom izražaja gena *Stam2* dobivene su nove spoznaje o tom genu, koje omogućavaju nove pretpostavke o ulozi tog gena. Izražaj gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja upućuje na ulogu tog gena u razvoju, posebno razvoju srca i središnjeg živčanog sustava. Prisutnost molekule STAM2 u područjima neuralne cijevi, gdje je utjecaj morfogena ključan za proces neurulacije i diferencijacije dijelova živčanog sustava, svakako ukazuje na mogućnost sudjelovanja STAM2 u tim procesima. Budući da se izražaj *Stam2* nastavlja u središnjem živčanom sustavu tijekom razvoja zametaka, te se dodatno proširuje na ograničena područja središnjeg živčanog sustava odraslih miševa, moguće je pretpostaviti da *Stam2* ima specifičnu ulogu tijekom razvoja i diferencijacije ovih područja.

Dosadašnja istraživanja molekule STAM2 dovela su do određenih pretpostavki o njenoj ulozi unutar stanice (35, 36, 39, 42, 46, 74). Rezultati analize izražaja *Stam2* iz ovog rada omogućuju prenošenje pretpostavki o ulozi tog gena unutar stanice na razinu tkiva i organa. Stoga će se uloga gena *Stam2* moći razumjeti samo povezivanjem uloge unutar stanice s ulogom u embrionalnom razvoju i funkcioniranju živčanog sustava.

5.2.3.1. STAM2 i unutarstanični prijenos podražaja

Prvi radovi o STAM2 dokazali su njegovu ulogu u unutarstaničnom prijenosu podražaja nizvodno od Janus kinaza (33, 35). Tirozinske ostatke STAM2 na poticaj čimbenika rasta (EGF, PDGF, GM-CSF) i citokina (IL-2 i IL-3; interleukin -2 i -3), fosforiliraju kinaze JAK1, JAK2 ili JAK3 (33, 36, 90). Štoviše, Endo i suradnici su pokazali da STAM2 sudjeluje i u citokinima posredovanoj indukciji gena *c-myc* odgovornog za pokretanje staničnog ciklusa i sintezu DNA (35). STAM2 u ovom slučaju vjerojatno djeluje kao prilagođivač, budući da posjeduje domenu SH3 kojom se veže za nizvodne molekule kao što su UBPY i AMSH, te ih povezuje sa Janus kinazama na koje je vezan svojom domenom ITAM (33, 40). Dokazano je da STAM1 u kompleksu s AMSH također ima presudnu ulogu u prijenosu podražaja nizvodno od JAK2 i JAK3 do *c-myc* na poticaj IL-2 i GM-CSF (41). Međutim, Yamada i suradnici su istražujući ulogu STAM1 i STAM2 pomoću timocita s onemogućena oba gena *Stam* pokazali da STAM1 i STAM2 nisu bitni za indukciju *c-myc* interleukinima IL-2 i IL-7 (91). Njihovo je istraživanje

ukazalo na utjecaj STAM1 i STAM2 na razvoj timocita, te na povezanost nedostatka bjelančevina STAM1 i STAM2 s pojačanom i produljenom aktivacijom Janus kinaza i p38MAPK (engl. *p38 mitogen-activated protein kinase*; protein-kinaza aktivirana mitogenom p38) (91). Točan mehanizam utjecaja bjelančevina STAM1 i STAM2, te Janus kinaza i p38MAPK na razvoj timocita još nije poznat.

5.2.3.2. STAM2 u endosomskoj regulaciji prijenosa podražaja

Procesom endocitoze stanica uklanja aktivirane receptore sa svoje površine, te tako utječe na jačinu podražaja koji se prenosi u njenu unutrašnjost (18). Endocitozom se dijelovi stanične membrane obloženi klatrinom uvlače u unutrašnjost stanice u obliku mjehurića, a zajedno s njima i receptori s vezanim signalnim molekulama. Klatrinski mjehurići stapaju se s ranim endosomima, da bi potom ograničena područja membrane ranih endosoma s ugrađenim receptorima pupanjem prema unutra stvorila nove mjehuriće i tako oblikovala multivezikularno tjelešce (slika 2) (19). Prije nego što uđu u mjehuriće multivezikularnih tjelešaca i tako krenu putem razgradnje u lizosomima, receptori se razvrstavaju na ranim endosomima, te se neki od njih vraćaju na površinu stanice i ne podliježu razgradnji. Stanica prepoznaje bjelančevine namijenjene razgradnji u lizosomima po molekuli ubikvitina koja je vezana za te bjelančevine (21).

Bjelančevine STAM posjeduju domene VHS i UIM, koje su smještene jedna do druge i vežu ubikvitinirane bjelančevine na ranim endosomima (39). Pored toga, domena SH3 unutar bjelančevina STAM se veže s deubikvitinirajućim enzimima UBPY i AMSH, koji mogu ukloniti ubikvitin i njemu slične molekule s bjelančevina označenih ubikvitinom (40, 41, 92, 93). Navedene činjenice upućuju na pretpostavku da bjelančevine STAM sudjeluju u ubikvitinaciji i deubikvitinaciji odgovarajućih molekula, a time i njihovom razvrstavanju na ranim endosomima.

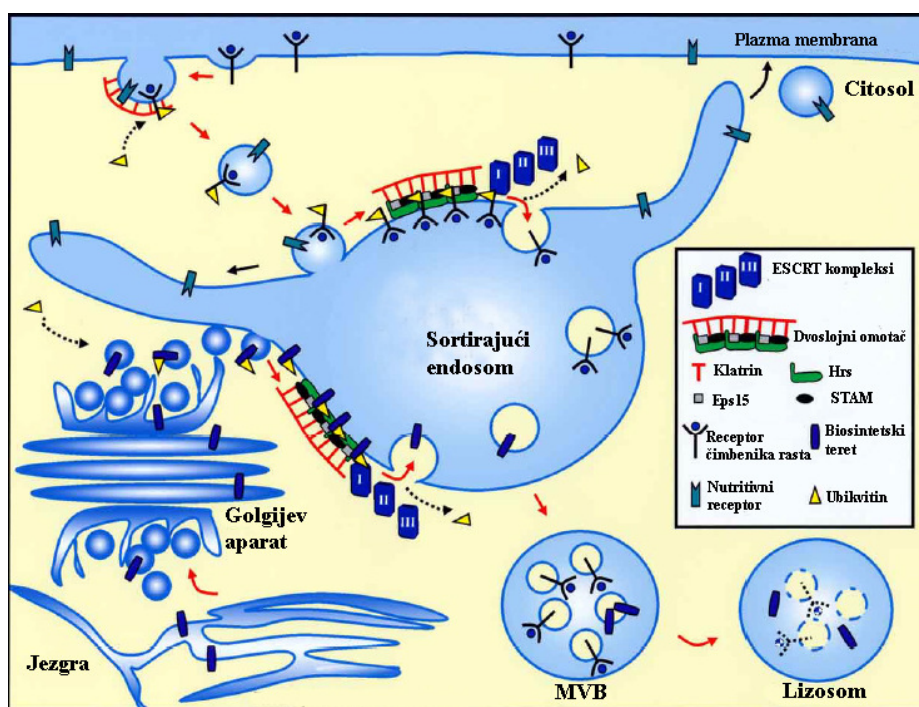
Detaljna karakterizacija molekula STAM2, STAM1 i HRS, pokazala je njihovu važnu ulogu u regulaciji broja receptora na površini stanice (engl. *receptor downregulation*). Još su Takata i suradnici pokazali da promijenjena bjelančevina STAM2 bez SH3 domene ili bez coiled-coil motiva, utječe na smanjenu razgradnju PDGF, ali ne i na njegovo uvlačenje u stanicu endocitozom (36). Ubrzo je postalo jasno da STAM2 djeluje u uskoj vezi s HRS-om, te da njegov smještaj na membrani ranih endosoma ovisi upravo o vezanju za HRS (36, 42, 47). Istraživanja srodnih molekula kod kvasaca pokazala su da promjene u bjelančevinima Vps27 (kvašćev analog HRS-u) i Hse1 (analog STAM2) dovode do poremećaja u prijenosu bjelančevina kroz endosome, te da bjelančevinski kompleks Vps27-Hse1 veže ubikvitin i

posreduje u razvrstavanju bjelančevina na endosomima (94). Kasnije se pokazalo da istu ulogu imaju HRS, STAM1 i STAM2 kod sisavaca (39, 44, 95).

Molekule STAM1 odnosno STAM2 djeluju zajedno s HRS i Eps15 s kojim čine trojni bjelančevinski kompleks (42, 44). Na poticaj čimbenika rasta (primjerice EGF, HGF i PDGF) tirozinski ostaci bjelančevina HRS i STAM se fosforiliraju (36, 90, 96). Fosforilacija tih bjelančevina predstavlja regulacijski mehanizam koji ih potiče na daljnje specifično djelovanje (97). HRS se specifično veže za fosfatidilinozitol(3)-fosfat na ograničenim područjima na membrani ranih endosoma za koja je pričvršćen ravni klatrinski omotač, različit od onoga na klatrinskim mjehurićima (98, 99). Svi članovi bjelančevinskog kompleksa HRS/STAM/Eps15 posjeduju domenu UIM i na sebe vežu ubikvitine (39, 44, 100, 101). Pojačani izražaj HRS-a ili STAM2 uzrokuje nakupljanje ubikvitiniranih bjelančevina u endosomima (39, 98, 102), dok onemogućavanje HRS-a putem RNAi ili “knock-out”-a gena *Stam1* i *Stam2* zaustavlja razgradnju aktiviranih receptor-tirozin-kinaza (44, 74). Na temelju dostupnih podataka, predložen je model za razvrstavanje ubikvitiniranih membranskih bjelančevina tijekom endocitoze koji uključuje i molekule HRS i STAM1 i 2 (38, 45, 95, 99). Receptori i ostale membranske bjelančevine prenose se do ranog endosoma (slika 25). Kompleks HRS/STAM/Eps15 prepoznaje ubikvitinirane bjelančevine i zadržava ih u klatrinom obloženim mikrodomenama u membrani endosoma. Membranske bjelančevine koje nisu ubikvitinirane slobodno difundiraju lateralno u endosomalnoj membrani i mogu biti vraćene u plazma membranu ili na trans – stranu Golgijevog aparata. Bjelančevine zadržane u mikrodomenama mogu se proslijediti na sljedeće razine u postupku razvrstavanja, u kojima sudjeluju kompleksi ESCRT (engl. *endosomal sorting complex required for transport*) (103). Na dosad nepoznat način, na rubovima mikrodomena započinje invaginacija endosomalne membrane. Ubikvitin se odstranjuje s membranskih bjelančevina i otpušta u citosol prije zatvaranja uvrnutih membrana (45).

Domena SH3 povezuje molekule STAM s deubikvitinirajućim enzimima UBPY i AMSH (40, 92). Inaktivacija AMSH dovodi do nakupljanja ubikvitina na endosomima, stabilizacije ubikvitiniranog oblika STAM2, te ubrzane razgradnje aktiviranog receptora za EGF (92). To ukazuje na moguću ulogu AMSH u negativnoj regulaciji broja receptora na staničnoj površini, deubikvitiniranjem receptora ili bjelančevina iz kompleksa HRS/STAM/Eps15 (38). Sličnu ulogu, pretpostavlja se, ima i UBPY, no moguće je da UBPY, poput bjelančevine Doa4, svog analoga u kvascu, sudjeluje u deubikvitinaciji bjelančevina neposredno prije ulaska u mjehuriće

multivezikularnog tjelešca, kako bi se spriječio odlazak ubikvitina u lizosome i njegova razgradnja.



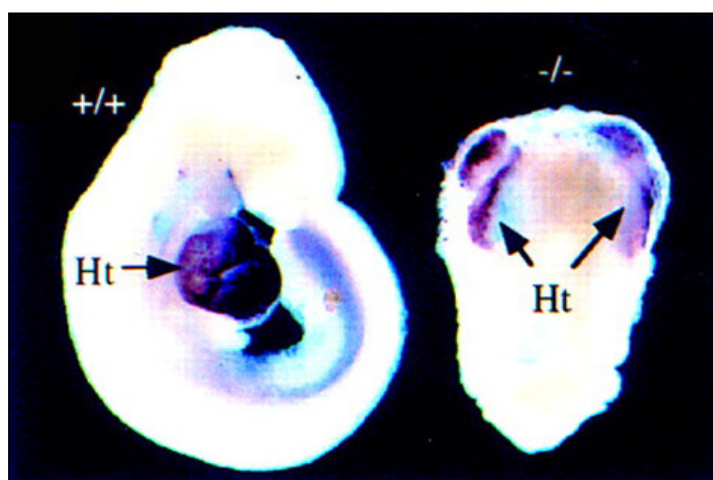
Slika 25. Shematski prikaz smještaja molekula STAM1, odnosno STAM2 na membrani ranih endosoma gdje sudjeluju u usmjeravanju ubikvitiniranih receptora prema multivezikularnim tjelešcima. (Preuzeto i prilagođeno iz 45)

5.2.3.3. STAM2 u embrionalnom razvoju

Izražaj *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja miševa očekivan je budući da su i analize izražaja gena *Hrs*, *Stam1* i *Eps15* pokazale da su ti geni izraženi tijekom embrionalnog razvoja, s određenim odstupanjima u rasporedu izražaja (88, 89, 104 - 106). *In vivo* istraživanja molekula HRS, STAM1, STAM2 i Eps15 dovela do spoznaje o važnosti tih molekula za embrionalni razvoj miševa (91, 104). „Knock-out“ miševi s onemogućenim genom *Hrs* umiru tijekom embriogeneze (oko E11), te pokazuju poremećaj u ventralnom savijanju zametnog cilindra koje se događa 8. dana embrionalnog razvoja, kada dolazi do poremećaja u građi srca, tj. dvije endokardijalne cjevčice se ne spoje u jedinstvenu srčanu cijev (*cardia bifida*) (104) (slika 26). Do poremećaja u ventralnom savijanju zametnog cilindra vjerojatno dolazi zbog ektopične disfunkcije stanica u definitivnom endodermu u kojima je još prije početka ventralnog savijanja zabilježena apoptoza (104). Vrlo sličan fenotip pokazuju dvostruki „knock-out“ miševi s

onemogućenim genima za STAM1 i STAM2 (91). Ti miševi također umiru na stadiju E11, te pokazuju poremećaj u ventralnom savijanju zametnog cilindra. Za razliku od dvostrukih „knock-out“ miševa, knock-out miševi s onemogućenim samo jednim *Stam* genom, pokazuju blažu promjenu fenotipa. Onemogućavanje gena *Stam1* rezultiralo je gubitkom tjelesne težine i hipokampalnih neurona, te smrću oko 6. mjeseca života, dok „knock-out“ za *Stam2* ne pokazuje vidljive promjene fenotipa u odnosu na divlji tip miševa (89, 91). Pretpostavlja se da se molekule STAM1 i STAM2 međusobno nadomještaju i time ublažavaju promjene fenotipa nastale kao posljedica onemogućavanja samo jednog od tih gena.

Analog HRS-a kod vinske mušice sudjeluje u regulaciji broja receptora (engl. *receptor downregulation*) za DPP (engl. *Decapentaplegic*, pripadnik porodice TGF- β), Hedgehog i Notch, što su sve evolucijski očuvani morfogeni važni za embrionalni razvoj miševa, posebno za razvoj živčanog sustava (107, 108). Pretpostavlja se da promjena fenotipa u „knock-out“ miševa s onemogućenim genom *Hrs* proizlazi iz poremećaja u specifičnom prijenosu podražaja u ili iz stanica definitivnog endoderma (38).



Slika 26. Usporedba mišjeg zametka divljeg tipa starog 9,5 dana s homozigotnim „knock-out“ zametkom iste starosti s onemogućenim genom *Hrs*. Imunobojanjem s protutijelom na teški lanac miozina prikazano je srce ovih zametaka, te se uočava poremećaj u razvoju srca homozigotnog nosioca preinake u *Hrs* (preuzeto iz 104).

Ni heterozigotni ni homozigotni nosioci preinake u genu *Stam2* nastale postupkom genske zamke ne pokazuju vidljive promjene fenotipa. Rođeni su zdravi, u očekivanom omjeru obzirom na Mendelov zakon nasljeđivanja, a njihova dužina života odgovara prosječnoj dužini života

miševa s istom genetskom podlogom (109). Isto tako ni „knock-out“ miševi s potpuno onemogućenim genom *Stam2* nisu pokazali promjenu fenotipa, što dokazuje da sam gen *Stam2* nije nužan kako za embrionalni razvoj, tako i za održanje životinja na životu (91).

Međutim, činjenica da „knock-out“ miševi s onemogućenim genom *Stam1* ne pokazuju drastičnu promjenu fenotipa, dok dvostruke mutante s onemogućena oba gena *Stam* pokazuju značajan poremećaj u embrionalnom razvoju, koji dovodi do smrti zametaka, dokazuje da uloga STAM2 u embrionalnom razvoju nije zanemariva (89, 91). Smatra se da STAM1 i STAM2 imaju istu ulogu, te da se međusobno nadomještaju u obavljanju istog zadatka (38, 91). Stoga je za istraživanje učinka onemogućavanja gena *Stam2* potrebno onemogućiti oba gena *Stam*. To ne isključuje mogućnost da STAM2 ima i svoju posebnu ulogu u embrionalnom razvoju.

Dvostruki knock-out miševi s onemogućenim genima *Stam1* i *Stam2* pokazuju vrlo sličan poremećaj embrionalnog razvoja kao i „knock-out“ miševi s onemogućenim genom *Hrs*. Oba „knock-out“ miša pokazuju poremećaj morfogeneze prilikom ventralnog savijanja zametnog cilindra oko 8. dana embrionalnog razvoja, što rezultira smrću zametaka oko 11. dana razvoja (104, 91). Pretpostavlja se da do poremećaja u razvoju dolazi prije samog procesa savijanja zametnog cilindra, pojavom neuobičajene apoptoze u stanicama definitivnog endoderma (104). Premda analiza izražaja gena *Stam2* na mišjoj liniji *Stam2^{Gt1Gaj}* nije pokazala aktivnost *Stam2* kod zametaka E8,5, *Stam2* je potom izražen u endodermu stražnjeg crijeva.

Izražaj gena *Stam2* tijekom razvitka u živčanom sustavu, srcu, endokrinim žlijezdama i epitelnim tkivima ukazuje na moguću ulogu STAM2 u razvoju tih organa. Pretpostavlja se da STAM2 ima posebnu važnost u razvoju srca i živčanog sustava obzirom da je u tim sustavima kontinuirano prisutan od sredine do kraja gestacijskog razdoblja. U ostalim organskim sustavima izražaj *Stam2* se pojavljuje tek pred kraj gestacijskog razdoblja. Budući da je *Stam2* ubikvitarno izražen u odraslim životinjama, moguće je da se počinje izražavati već nekoliko dana prije okota kako bi sudjelovao u završnoj funkcionalnoj diferencijaciji ovih organa. Slično ponašanje pokazuje i *Hrs* koji je ubikvitarno izražen u ranijim stadijima razvitka, kada je potreban za pravilno ventralno savijanje zametnog cilindra, no kasnije je, sredinom gestacijskog razdoblja intenzivniji samo u živčanom sustavu, a tek 16. dan razvitka počinje jačati njegov izražaj i u ostalim organskim sustavima (88, 104). Moguće je da je HRS važan za ranije stadije razvoja, a kasnije samo za razvoj živčanog sustava, dok je u ostalim organskim sustavima bitan tek za normalan rad tih organa nakon okota. Relativno ubikvitaran izražaj gena *Stam1* u mišjim zamecima starim 18,5 dana, mogla bi također biti samo priprema tih organa za početak rada nakon okota (89).

Rasprostranjenost izražaja *Stam2* po organskim sustavima neposredno pred kraj trudnoće, pokazuje da je *Stam2* izražen u endokrinim organima (hipofiza, nadbubrežna žlijezda, spolne žlijezde), u organima gdje je naglašena sekrecijska aktivnost stanica. Iz toga bi se moglo zaključiti da u tim organima STAM2 sudjeluje u regulaciji sekrecije, odnosno egzocitoze. Prisutnost izražaja *Stam2* u epidermisu kože i sluznici jezika i usne šupljine upućuje na ulogu STAM2 u razvrstavanju bjelančevina na membrani ranih endosoma budući da je razvrstavanje i usmjeravanje bjelančevina u različita membranska područja važan zadatak epitelnih stanica (110, 111).

5.2.3.3.1. STAM2 u razvoju živčanog sustava

Jedan od načina na koji se usmjerava diferencijacija stanica i tkiva je međudjelovanje stanica. To se naziva induksijsko međudjelovanje, kao na primjer indukcija neurulacije od strane notokorda. Stanice djeluju jedne na druge izravnom komunikacijom staničnim dodirima ili izlučivanjem signalnih molekula koje difundiraju do okolnih stanica. Takve signalne molekule zovu se morfogeni. Ovisno o gradijentu koncentracije morfogena, različiti dijelovi osnove zametka različito će odgovoriti na podražaj i nastat će različite strukture zametka. Djelovanje morfogena regulira se i različitom koncentracijom receptora u ciljnim stanicama. Poznato je da gradijent morfogena Shh ključan za razvoj ventralnog dijela neuralne cijevi. Shh se najprije sintetizira u notokordu, a potom i u ploči dna, te se širi i gradijentom koncentracije utječe na razvoj struktura ventralnog dijela središnjeg živčanog sustava (112, 113). Na sličan način pripadnici superporodice TGF- β reguliraju razvoj struktura u dorzalnom dijelu neuralne cijevi. Signalni centar odakle se širi gradijent koncentracije tih morfogena nalazi se u notokordu, a potom u ploči dna (114, 115). Zanimljivo je da se izražaj *Stam2* pojavljuje upravo u tim područjima ključnim za razvoj neuralne cijevi. Uz pretpostavku da STAM2 zajedno s HRS-om i Eps15 sudjeluje u regulaciji broja receptora za morfogene, može se zaključiti da ima ulogu u razvoju ventralnog i dorzalnog dijela neuralne cijevi prilagođavanjem induksijskog djelovanja morfogena i prepoznavanjem njihovog gradijenta koncentracije (38).

Izražaj *Stam2* u „subplate“ zoni i kortikalnoj ploči kore velikog mozga, te u hipokampusu mišjih zametaka, u razvojno vrlo dinamičnim područjima s intenzivnom međustaničnom komunikacijom i prisutnim morfogenima, ukazuje na moguću ulogu STAM2 u regulaciji prijenosa podražaja. Pretpostavlja se da bi uloga STAM2 u razvoju tih područja mogla biti više povezana s rastom (rast aksona), nego s uspostavom funkcije (sinaptogeneza), jer se izražaj *Stam2* pojavljuje u „subplate“ zoni (gdje su prve sinapse) tek nakon pojave u intermedijarnoj

zoni, gdje prevladava rast aksona i seljenje neurona, a nema ga u marginalnoj zoni, području intenzivne sinaptogeneze (116 – 118). Uloga STAM2 u rastu aksona, umnažanju i seljenju neurona mogla bi se raspravljati i u okviru unutarstanične uloge kompleksa HRS/STAM/Eps15 u endosomskoj regulaciji prijenosa podražaja i njegove povezanosti s djelovanjem morfogenata (119, 120). Morfogeni imaju širok spektar djelovanja (121). Dokazano je da Shh kao morfogen iz signalnih centara u notokordu i ploči dna upravlja procesima dorzo-ventralnog oblikovanja središnjeg živčanog sustava, te kontrolira ponašanje matičnih stanica mišjeg embrionalnog neokorteksa i umnažanje stanica ventralnog dijela i subventrikularne zone prednjeg mozga i hipokampusa (122, 123). Shh sudjeluje i u diferencijaciji oligodendrocita, umnažanju preteča živčanih stanica i kontroli rasta aksona (124). Moguće je da STAM2 i ostale molekule iz kompleksa HRS/STAM/Eps15 poput Shh djeluju u različitim razvojnim procesima, te da postoji međudjelovanje Shh i kompleksa HRS/STAM/Eps15. Time bi se objasnio izražaj *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja u notokordu, ploči dna i u područjima kore velikog mozga gdje se odvijaju procesi upravljani signalnim molekulama, morfogenima, kao što su umnažanje i seljenje neurona, te rast aksona.

5.2.3.4. STAM2 u središnjem živčanom sustavu odraslih miševa

Premda vjerojatno STAM2 ne sudjeluje u procesu sinaptogeneze, postoje pokazatelji koji upućuju na njegovu ulogu u regulaciji provođenja podražaja sinapsama. Ta je moguća uloga vezana uz molekulu HRS, odnosno bjelančevinski kompleks HRS/STAM/Eps15. Analog bjelančevine HRS u štakora, HRS-2, identificiran je kao molekula koja preko SNAP-25 (engl. *synaptosome-associated protein of 25 kDa*), uz pomoć kalcijevih iona i ATP sudjeluje u regulaciji vezikularnog transporta i egzocitoze (125, 126). *Hrs-2* je izražen u mozgu odraslog štakora. Pronađen je i u sekretornim zrnima i mjehurićima morfološki sličnim sinaptičkim u PC12 stanicama diferenciranim u kulturi dodatkom čimbenikom rasta neurona (88, 127). *Stam2* je, kao i *Hrs* izražen u slojevima kore velikog mozga i piramidnom sloju hipokampusa odraslog miša, područjima gdje neuroni sadrže brojne sinapse. S obzirom na ulogu HRS-a i STAM2 u egzocitozi sekrecijskih zrnaca (46), te mogućoj ulozi HRS-a u otpuštanju presinaptičkih mjehurića, pretpostavlja se da kompleks HRS/STAM2 sudjeluje i u sinapsama. Moguća uloga STAM2 u sinapsi je u stapanju presinaptičkih mjehurića s presinaptičkom membranom na što ukazuju istraživanja o HRS-2 i SNAP-25 (125, 126). S druge strane, STAM2 bi mogao regulirati otpuštanje presinaptičkih mjehurića kao kod otpuštanja sekrecijskih zrnaca u mastocitima (46). Otpuštanje sekrecijskih zrnaca u mastocitima ovisno je o aktivaciji receptora za IgE (imunoglobulin E), te aktivaciji niza signalnih bjelančevina nizvodno od receptora, tzv. signalnoj

kaskadi (128). Moguće je da STAM2 regulira taj proces aktivacije uklanjanjem određenih molekula iz te kaskade i njihovim usmjeravanju prema MVB, odnosno lizosomima.

5.3. STAM2 u staničnim zbivanjima vezanim uz zdravlje i bolest

Analiza izražaja gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja, te u mozgu novorođenih i odraslih miševa predstavlja doprinos istraživanju uloge molekule STAM2 u razvoju mišjih zametaka, posebice u razvoju živčanog sustava. Budući da STAM2 sudjeluje u prijenosu podražaja i endocitozi, njenim istraživanjem se dobiva uvid u značenje tih procesa u razvoju te u normalnom funkcioniranju živčanog sustava. Istraživanje molekule STAM2 omogućuje i istraživanje međusobne povezanosti procesa endocitoze i prijenosa podražaja kroz stanicu. Tako je istraživanje uloge molekule *intersectin* u procesima endocitoze i prijenosa podražaja dovelo do otkrića endocitozom uvjetovane aktivacije receptora na ranim endosomima. Time je pokazano da endocitoza ne sudjeluje samo u utišavanju podražaja (engl. *signal attenuation*) već ima važnu ulogu u aktivaciji i prenošenju podražaja (129).

Posljednjih godina, istraživanje odnosa procesa endocitoze i prijenosa podražaja tijekom embriogeneze dovelo je do novih značajnih rezultata (130). Dokazano je da u stvaranju početne asimetrije prethodno istovjetnih, totipotentnih stanica tijekom rane embriogeneze važnu ulogu ima proces endocitoze i razvrstavanje bjelančevina na multivezikularnim tjelešcima koji reguliraju aktivnost molekula Notch i Delta (131, 132). Pored molekule Numb, represora prijenosa podražaja putem molekule Notch, ključnu ulogu ima asimetrično smještena ubikvitin ligaza Neuralized koja regulira endocitozu molekule Delta vezane za Notch i tako izravno potiče cijepanje molekule Notch i prijenos podražaja (133).

Spoznaje dobivene istraživanjem normalnog djelovanja molekula i procesa u kojima one sudjeluju, pomažu otkrivanju etiopatogeneze bolesti. Zbivanja tijekom rane embriogeneze i molekule koje u njima sudjeluju evolucijski su očuvana, pa pogreške u tim procesima dovode do fizioloških i razvojnih poremećaja (132, 134). Smatra se da poremećaji u razvrstavanju molekule Notch na ranim endosomima može dovesti do stvaranja tumora ili malformacija (135).

Proučavanje virusa i mehanizama kojima oni iskorištavaju stanicu i procese unutar nje da bi preživjeli i razmnožavali se donosi dvostruku korist: takvim se istraživanjima dolazi do mogućih načina sprečavanja aktivnosti virusa, što je važno u terapijske svrhe, a drugo je što ponašanje virusa unutar stanice otkriva još nepoznate unutarstanične procese i uloge pojedinih molekula.

Slično je i s proučavanjem virusa koji u svom djelovanju koriste procese endocitoze i stvaranja multivezikularnih tjelešaca. Otkriveno je da virusi HIV i Ebola iskorištavaju sustav za razvrstavanje na multivezikularnim tjelešcima i ESCRT komplekse za svoje pupanje (136 - 138). Virusne domene koje omogućuju takvo pupanje virusa HIV i Ebola, vrlo su slične domenama molekule HRS, što s jedne strane predstavlja dokaz o ulozi molekule HRS, a time i molekule STAM2 u vezanju ESCRT i ubikvitin ligaza za rane endosome, a s druge strane ukazuje na mogućnost da ti virusi oponašaju molekulu HRS kako bi postigli svoj cilj, tj. pupanjem izašli iz stanice (19). Takva istraživanja će u budućnosti biti koristan doprinos pronalasku određenih lijekova i cjepiva za takve bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. Transgenična mišja linija *Stam2*^{Gt1Gaj} je odgovarajući model za određivanje izražaja gena *Stam2*

Genskom zamkom ugrađen je vektor pKC199 β geo između drugog i trećeg egzona gena *Stam2*. Rezultat transkripcije preinačenog gena *Stam2* je promijenjena mRNA koja daje stopljenu bjelančevinu sastavljenu od N-kraja bjelančevine STAM2 i proizvoda gena β geo. Stopljena bjelančevina pokazuje aktivnost β -galaktozidaze kao odraz izražaja gena *Stam2*. Normalan transkript *Stam2* prisutan u tkivima homozigotnih nosilaca preinake ne uzrokuje stvaranje mjerljive količine bjelančevine STAM2. Tijekom transkripcije gena *Stam2* odvija se alternativno prekrajanje koje ne uzrokuje stvaranje bjelančevine STAM2.

2. Prisutnost mRNA, te bjelančevine STAM2 dokazana je u svim ispitivanim organima odraslih miševa

Određivanje rasprostranjenosti mRNA gena *Stam2* u organima odraslih miševa divljeg tipa postupkom RT-PCR pokazalo je da je normalna mRNA prisutna u svim ispitivanim organima, dok je mRNA nastala alternativnim prekrajanjem prisutna u živčanom i mišićnom tkivu. Postupkom western blot potvrđena je prisutnost normalne bjelančevine STAM2 u organima miševa divljeg tipa.

3. Izražaj gena *Stam2* određen bojanjem na β -galaktozidazu prisutan je u mišjim zamecima od razvojnog stadija E9,5 do E18,5

Analiza izražaja gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja pokazala je da se izražaj *Stam2* prvo nakratko pojavljuje u stražnjem primitivnom crijevu zametka, a zatim srcu i središnjem živčanom sustavu zametaka gdje ostaje izražen do kraja embrionalnog razvoja. Pred kraj gestacijskog razdoblja izražaj *Stam2* se pojavljuje u endokrinom sustavu (spolne žlijezde, nadbubrežna žlijezda, hipofiza) i pokrovnom epitelu (koža, sluznica usne šupljine i jezika).

4. Izražaj gena *Stam2* određen bojanjem na β -galaktozidazu prisutan je u mozgu novorođenih i odraslih miševa

Izražaj gena *Stam2* prisutan je kortikalnoj ploči, hipokampusu i olfaktornim bulbusima, a slabije u ventralnom dijelu periakveduktalne sive tvari, ganglijskom brežuljku i putamenu novorođenih miševa. Kod odraslih miševa, izražaj *Stam2* je također prisutan kori velikog mozga, hipokampusu i olfaktornim bulbusima, zatim u bazalnim ganglijima, lateralnoj septalnoj jezgri, organumu subfornicale, striji medularis, medijalnoj habenularnoj jezgri epitalamusa, ventralnoj slušnoj jezgri, jezgrama ponsa, donjem kolikulu i slabije u periakveduktalnoj sivoj tvari. *Stam2* je izražen i u kori malog mozga.

5. Izražaj gena *Stam2* upućuje na njegovu ulogu u embrionalnom razvoju miša

Izražaj gena *Stam2* tijekom razvitka u živčanom sustavu, srcu, endokrinim žlijezdama i epitelnim tkivima ukazuje na moguću ulogu STAM2 u razvoju tih organa. Rezultati ovog istraživanja zajedno s literaturnim podacima upućuju na ulogu STAM2 u regulaciji prijenosa podražaja važnih za rast i diferencijaciju stanica u područjima izražaja *Stam2*. U razvoju neuralne cijevi, te diferencijaciji slojeva kore velikog mozga moguća je povezanost uloge STAM2 s indukcijskim djelovanjem morfogena. Pored uloge u regulaciji endocitoze receptora namijenjenih razgradnji u lizosomima, STAM2 bi mogao imati ulogu u sekrecijskoj aktivnosti stanica endokrinih organa, te u radu sinapsi u mozgu odraslih miševa.

7. SAŽETAK

Prijenos podražaja i njegova regulacija pomoću endocitoze i razgradnje receptora u lizosomima važni su procesi u embrionalnom razvoju sisavaca, te u razvoju i normalnom funkcioniranju živčanog sustava. STAM2 je bjelančevina smještena na ranim endosomima, te postoje dokazi da sudjeluje u razvrstavanju receptora namijenjenih razgradnji u lizosomima. Cilj rada bio je odrediti područja izražaja gena *Stam2* praćenjem aktivnosti enzima β -galaktozidaze na zamecima i mozgovima odraslih miševa linije *Stam2^{Gt1Gaj}* i time dobiti nove spoznaje o njegovoj mogućoj ulozi u razvoju mišjih zametaka i funkcioniranju središnjeg živčanog sustava odraslih miševa. Mišja linija *Stam2^{Gt1Gaj}* dobivena je postupkom genske zamke gdje vektor pKC199 β geo ugradnjom u gen *Stam2* onemogućuje stvaranje, a time i funkcioniranje normalne bjelančevine STAM2. Vektor genske zamke sadrži gen za β -galaktozidazu bez vlastitog promotora, pa se praćenjem aktivnosti β -galaktozidaze može odrediti izražaj gena *Stam2*. Analiza preinačenog gena *Stam2*, te njegovih transkripata i bjelančevine STAM2, pokazala je da preinačeni gen daje promijenjeni transkript od kojeg nastaje stopljena bjelančevina s aktivnošću β -galaktozidaze, te da se tijekom transkripcije događa alternativno prekrajanje gena *Stam2*, koje ne uzrokuje stvaranje bjelančevine STAM2. Normalni transkript gena *Stam2* prisutan je u svim ispitivanim organima odraslog miša divljeg tipa. Izražaj *Stam2* određen histokemijskim bojanjem na β -galaktozidazu vidljiv je između razvojnih stadija E9,5 i E18,5 u primitivnom stražnjem crijevu, osnovi središnjeg živčanog sustava i srcu, te pred kraj gestacijskog razdoblja u organima endokrinog sustava i pokrovnom epitelu zametaka. U mozgu novorođenih kao i odraslih miševa *Stam2* je intenzivno izražen na području kore velikog mozga, hipokampusu i olfaktornih bulbosa, a vidljiv je i u jezgrama sive tvari velikog mozga, te kori malog mozga. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na moguću ulogu STAM2 u razvoju živčanog sustava, srca, endokrinih žlijezda i epitelnih tkiva, te da bi ta uloga mogla biti povezana s ulogom STAM2 u regulaciji prijenosa podražaja pomoću endocitoze.

8. SUMMARY

Signal transduction and receptor downregulation by endocytic pathway are crucial processes in mammalian embryonic development and normal functioning of nervous system. STAM2 is a protein located on early endosomes and evidences exist that it participates in receptor sorting during endocytic pathway. The aim of the research was to determine *Stam2* expression pattern in mouse embryos and the brain of adult *Stam2*^{Gt1Gaj} mice by histochemical staining for β -galactosidase in order to get insight into its possible role in the development of the mouse embryos and adult central nervous system. The mouse line *Stam2*^{Gt1Gaj} was produced by gene trap method where the pKC199 β geo vector was introduced into *Stam2* gene, and consequently impaired the STAM2 protein production and functioning. The gene trap vector contained promoterless *lacZ* gene coding for β -galactosidase; hence the β -galactosidase activity reflected the *Stam2* expression. Analysis of the modified *Stam2* gene and its transcripts and STAM2 protein revealed a mutant transcript giving a fusion protein with β -galactosidase activity. Additionally, an alternative splicing event was found to occur during *Stam2* transcription, but it did not result in STAM2 protein. The normal *Stam2* transcript was present in all adult wild type mice organs tested. *Stam2* expression detected by histochemical staining for β -galactosidase was present in mouse embryos between developmental stages E9.5 and E18.5 in primitive hindgut, future central nervous system and heart, and toward the end of gestation in some organs of endocrine system and in the covering epithelia. *Stam2* was strongly expressed in the forebrain cortex, hippocampus and olfactory bulbs of newborn as well as adult mice. It was also visible in the grey matter nuclei and the cerebellar cortex. The results of this research showed a possible role of STAM2 in the development of nervous system, heart, endocrine glands and epithelial tissues and indicated that could be related to its role in signal transduction regulation by endocytic pathway.

9. POPIS LITERATURE

1. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of Neural Science. 4th edition. McGraw-Hill 2000.
2. Brivanlou AH, Darnell JE. Signal transduction and the control of gene expression. Science 2002;295:813-8.
3. Cooper GM, Hausman RE. The Cell - A Molecular Approach. 2nd edition. Geoffrey M Cooper 2004.
4. Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 1980;284:17-22.
5. Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. Trends Biochem Sci 2005;30:286-90.
6. Clapham DE. Calcium signaling. Cell 1995;80:259-68.
7. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 2002;296:1655-7.
8. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. Science 2002;296:1636-9.
9. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science 1997;278:2075-80.
10. Simon MA. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. Cell 2000;103:13-5.
11. Watowich SS, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. Annu Rev Cell Dev Biol 1996;12:91-128.
12. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2000;103:211-25.
13. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. Science 2002;296:1653-5.
14. www.proteincenter.rub.de/sfb642/forschungsprogramm.htm
15. www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2003/lect06.htm
16. www.med.nyu.edu/Research/bache02.gif

17. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002;296:1646-7.
18. Tsao P, Cao T, von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:91-6.
19. Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:446-55.
20. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:893-905.
21. Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 2003;162:413-23.
22. Reggiori F, Pelham HR. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J* 2001;20:5176-86.
23. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 2003;5:461-6.
24. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;3:17-23.
25. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 4th edition. New York: Garland Publishing 2002.
26. Beatus P, Lendahl U. Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res* 1998;54:125-36.
27. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;284:770-6.
28. Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(2):93-102.
29. Mehlen P, Mille F, Thibert C. Morphogens and cell survival during development. *J Neurobiol* 2005;64:357-66.
30. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993;75:1401-16.
31. Seto ES, Bellen HJ and Lloyd TE: When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev* 2002;16:1314-36.

32. Dubois L, Lecourtois M, Alexandre C, Hirst E, Vincent JP. Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in *Drosophila* embryos. *Cell* 2001;105:613-24.
33. Pandey A, Fernandez MM, Steen H, Blagoev B, Nielsen MM, Roche S, et al. Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, STAM2, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275:38633-9.
34. Takeshita T, Arita T, Asao H, Tanaka N, Higuchi M, Kuroda H et al. Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:1035-39.
35. Endo K, Takeshita T, Kasai H, Sasaki Y, Tanaka N, Asao H, et al. STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases. *FEBS Lett* 2000;477:55-61.
36. Takata H, Kato M, Denda K, Kitamura N. A hrs binding protein having a Src homology 3 domain is involved in intracellular degradation of growth factors and their receptors. *Genes Cells* 2000;5:57-69.
37. Ćurlin M, Kostović-Knežević L, Gajović S. Gene trap mutagenesis of three genes expressed during mouse embryo development. *Period Biol* 2002;104:47-54.
38. Komada M, Kitamura N. The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biochem (Tokyo)* 2005;137:1-8.
39. Mizuno E, Kawahata K, Kato M, Kitamura N, Komada M. STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Mol Biol Cell* 2003;14:3675-89.
40. Kato M, Miyazawa K, Kitamura N. A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J Biol Chem* 2000;275:37481-7.
41. Tanaka N, Kaneko K, Asao H, Kasai H, Endo Y, Fujita T, et al. Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem* 1999;274:19129-35.
42. Mizuno E, Kawahata K, Okamoto A, Kitamura N, Komada M. Association with Hrs Is Required for the Early Endosomal Localization, Stability, and Function of STAM. *J Biochem (Tokyo)* 2004;135:385-96.

43. Asao H, Sasaki Y, Arita T, Tanaka N, Endo K, Kasai H, et al. Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. *J Biol Chem* 1997;272:32785-91.
44. Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* 2003;278:12513-21.
45. Raiborg C, Stenmark H. Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct* 2002;27:403-8.
46. Murai S, Kitamura N. Involvement of hrs binding protein in IgE receptor-triggered exocytosis in RBL-2H3 mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:752-6.
47. Komada M, Kitamura N. Hrs and hbp: possible regulators of endocytosis and exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1065-9.
48. Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 1994;10:286-92.
49. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 1997;16:277-82.
50. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J et al. A physical map of the human genome. *Nature* 2001;409:934–41.
51. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304–51.
52. Silva J, Chang K, Hannon GJ, Rivas FV. RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* 2004;23:8401-9.
53. Brown SD, Nolan PM. Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Hum Mol Genet* 1998;7:1627-33.
54. Rugh R. The mouse: its reproduction and development. 1st edition. Burges Publishing Co 1968.
55. Hrvatski sabor. Zakon o dobrobiti životinja. Narodne novine 1999;19.
56. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther* 2004;11:64-6.
57. Anderson KV, Ingham PW. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nat Genet* 2003;33:285-93.

58. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
59. Evans MJ, Carlton MB, Russ AP. Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet* 1997;13:370-4.
60. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309:255-6.
61. Melton DW. Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 1994;16:633-8.
62. Joyner AL, Guillemot F. Gene targeting and development of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:37-42.
63. Robbins J. Gene targeting. The precise manipulation of the mammalian genome. *Circ Res* 1993;73:3-9.
64. Soriano P. Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci* 1995;18:1-18.
65. Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes WC. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 1989;244:463-5.
66. Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 1991;5:1513-23.
67. Skarnes WC, Auerbach BA, Joyner AL. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lac Z reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev* 1992;6:903-18.
68. von Melchner H, DeGregori JV, Rayburn H, Reddy S, Friedel C, Ruley HE. Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes Dev* 1992;6:919-27.
69. Wurst W, Rossant J, Prideaux V, Kownacka M, Joyner A, Hill DP et al. A large-scale gene-trap screen for insertional mutations in developmentally regulated genes in mice. *Genetics* 1995;139:889-99.
70. Gajovic S, Chowdhury K, Gruss P. Genes expressed after retinoic acid-mediated differentiation of embryoid bodies are likely to be expressed during embryo development. *Exp Cell Res* 1998;242:138-43.
71. Joyner AL, Auerbach A, Skarnes WC. The gene trap approach in embryonic stem cells: the potential for genetic screens in mice. *Ciba Found Symp* 1992;165:277-88.

72. Thomas T, Voss AK, Chowdhury K, Gruss P. A new gene trap construct enriching for insertion events near the 5' end of genes. *Transgenic Res* 2000;9:395-404.
73. http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/
74. Kanazawa C, Morita E, Yamada M, Ishii N, Miura S, Asao H et al. Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:848-56.
75. Theiler K. The house mouse: development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. Springer-Verlag, Berlin, (pretiskano 1989, s manjim promjenama)
76. Curlin M, Lucic V, Gajovic S. Splice variant of mouse *Stam2* mRNA in nervous and muscle tissue contains additional exon with stop codon within region coding for VHS domain. *Croat Med J* 2006;47:16-24.
77. McClive P, Pall G, Newton K, Lee M, Mullins J, Forrester L. Gene trap integrations expressed in the developing heart: insertion site affects splicing of the PT1-ATG vector. *Dev Dyn* 1998;212:267-76.
78. Skarnes WC. Entrapment vectors: a new tool for mammalian genetics. *Biotechnology (NY)* 1990;8:827-31.
79. Takeuchi T. A gene trap approach to identify genes that control development. *Dev Growth Differ* 1997;39:127-34.
80. Boue S, Letunic I, Bork P. Alternative splicing and evolution. *BioEssays* 2003;25:1031-4.
81. Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:273-82.
82. Kondrashov FA, Koonin EV. Evolution of alternative splicing: deletions, insertions and origin of functional parts of proteins from intron sequences. *Trends Genet* 2003;19(3):115-9.
83. Makalowski W. Not junk after all. *Science* 2003;300:1246-7.
84. Modrek B, Lee CJ. Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet* 2003;34:177-80.
85. Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1995;251:334-45.

86. Mitchell GA, Labuda D, Fontaine G, Saudubray JM, Bonnefont JP, Lyonnet S et al. Splice-mediated insertion of an Alu sequence inactivates ornithine delta-aminotransferase: a role for Alu elements in human mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:815-9.
87. Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet* 1994;10:188-93.
88. Tsujimoto S, Pelto-Huikko M, Aitola M, Meister B, Vik-Mo EO, Davanger S et al. The cellular and developmental expression of hrs-2 in rat. *Eur J Neurosci* 1999;11:3047-3063.
89. Yamada M, Takeshita T, Miura S, Murata K, Kimura Y, Ishii N, et al. Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol Cell Biol* 2001;21:3807-19.
90. Takeshita T, Arita T, Higuchi M, Asao H, Endo K, Kuroda H et al. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* 1997;6:449-457.
91. Yamada M, Ishii N, Asao H, Murata K, Kanazawa C, Sasaki H, et al. Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol Cell Biol* 2002;22:8648-58.
92. McCullough J, Clague MJ, Urbe S. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol* 2004;166:487-92.
93. McCullough J, Row PE, Lorenzo O, Doherty M, Beynon R, Clague MJ et al. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol* 2006;16:160-5.
94. Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 2002;4:534-9.
95. Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 2003;162:435-42.
96. Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Madshus IH, Stenmark H. Phosphorylation of Hrs downstream of the epidermal growth factor receptor. *Eur J Biochem* 2002;269:3881-7.
97. Row PE, Clague MJ, Urbe S. Growth factors induce differential phosphorylation profiles of the Hrs-STAM complex: a common node in signalling networks with signal-specific properties. *Biochem J* 2005;389:629-36.

98. Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *Embo J* 2001;20:5008-21.
99. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madhus IH, Stang E, Stenmark H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* 2002;4:394-98.
100. Hofmann K, Falquet L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 2001;26:347-50.
101. Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G et al. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 2002;416:451-5.
102. Bishop N, Horman A, Woodman P. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* 2002;157:91-101.
103. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 2001;106:145-55.
104. Komada M, Soriano P. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev* 1999;13:1475-1485.
105. Avantaggiato V, Torino A, Wong WT, Di Fiore PP, Simeone A. Expression of the receptor tyrosine kinase substrate genes *eps8* and *eps15* during mouse development. *Oncogene* 1995;11:1191-8.
106. Offenhauser N, Santolini E, Simeone A, Di Fiore PP. Differential patterns of expression of *Eps15* and *Eps15R* during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2000;95:309-12.
107. Lloyd TE, Atkinson R, Wu MN, Zhou Y, Pennetta G, Bellen HJ. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in *Drosophila*. *Cell* 2002;108:261-9.
108. Jekely G, Rorth P. Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in *Drosophila*. *EMBO Rep* 2003;4:1163-68.

109. Ćurlin M. Magistarski rad: Istraživanje mišjeg gena *lobel* pronađenog postupkom genske zamke. 2000.
110. Nelson WJ, Yeaman C. Protein trafficking in the exocytic pathway of polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol* 2001;11:483-6.
111. Altschuler Y, Hodson C, Milgram SL. The apical compartment: trafficking pathways, regulators and scaffolding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:423-9.
112. Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA et al. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 1995;81:445-55.
113. Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL et al. Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 1999;398:622-7.
114. Liem KF Jr, Tremml G, Roelink H, Jessell TM. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 1995;82:969-79.
115. Liem KF Jr, Tremml G, Jessell TM. A role for the roof plate and its resident TGF β -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 1997;91:127-38.
116. Rakic P. Timing of major ontogenetic events in the visual cortex of the rhesus monkey. *UCLA Forum Med Sci* 1975;18:3-40.
117. Zecevic N. Synaptogenesis in layer I of the human cerebral cortex in the first half of gestation. *Cereb Cortex* 1998;8:245-52.
118. Kanold PO. Transient microcircuits formed by subplate neurons and their role in functional development of thalamocortical connections. *Neuroreport* 2004;15:2149-53.
119. Incardona JP, Gruenberg J, Roelink H. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothened in endosomes. *Curr Biol* 2002;12:983-95.
120. Rives AF, Rochlin KM, Wehrli M, Schwartz SL, Dinardo S. Endocytic trafficking of Wingless and its receptors, Arrow and DFrizzled-2, in the *Drosophila* wing. *Dev Biol.* 2006 Mar 9; [Epub ahead of print]
121. Salie R, Niederkofler V, Arber S. Patterning molecules; multitasking in the nervous system. *Neuron* 2005;45:189-92.

122. Palma V, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 2004;131:337-45.
123. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 2005;132:335-44.
124. Marti E, Bovolenta P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 2002;25:89-96.
125. Bean AJ, Seifert R, Chen YA, Sacks R, Scheller RH. Hrs-2 is an ATPase implicated in calcium-regulated secretion. *Nature* 1997;385:826-9.
126. Graham ME, Washbourne P, Wilson MC, Burgoyne RD. Molecular analysis of SNAP-25 function in exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:210-21.
127. Kwong J, Roundabush FL, Hutton Moore P, Montague M, Oldham W, Li Y et al. Hrs interacts with SNAP-25 and regulates Ca(2+)-dependent exocytosis. *J Cell Sci* 2000;113:2273-84.
128. Beaven M A, and Baumgartner R A. Downstream signals initiated in mast cells by FcεRI and other receptors. *Curr Opin Immunol* 1996;8:766–72.
129. McPherson PS, Kay BK, Hussain NK. Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* 2001;2:375-84.
130. Gonzalez-Gaitan M, Stenmark H. Endocytosis and signaling: a relationship under development. *Cell* 2003;115:513-21.
131. Lai EC. Protein degradation: four E3s for the Notch pathway. *Curr Biol* 2002;12:R74–8.
132. Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F. The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 2005;132:1751-62.
133. Le Borgne, R., and Schweisguth, F. Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell* 2003;5:139–48.
134. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
135. Wilkin MB, Carbery AM, Fostier M, Aslam H, Mazaleyra SL, Higgs J et al. Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins. *Curr Biol* 2004;14:2237-44.

136. Pornillos O, Garrus JE, Sundquist WI. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* 2002;12:569-79.
137. Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P et al. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* 2002;3:718-29.
138. von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003;114:701-13.

10. ŽIVOTOPIS

Marija Ćurlin je rođena 17. kolovoza 1973. u Varaždinu, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. 1992. godine upisala je studij biologije, smjer molekularna biologija na Prirodoslovno matematičkom fakultetu u Zagrebu. Diplomirala je 1997. godine diplomskim radom pod naslovom: „Vrste privremenih fetalnih neurona u ljudskoj moždanoj kori“. Tijekom studija nagrađena je Rektorovom nagradom za najbolji studentski znanstveni rad. Poslijediplomski studij biologije, smjer biomedicina, završila je 2000. godine magistarskim radom: „Istraživanje mišjeg gena *lobel* pronađenog postupkom genske zamke“. Od 1997. godine zaposlena je na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu kao znanstveni novak te od 2003. godine kao asistent. Suradnica je na projektu: „Određivanje uloge gena u razvoju živčanog sustava miša“ voditeljice prof.dr.sc. Lj. Kostović-Knežević, te na projektu: „Ekspresija i funkcija proteina jezgrice Noll u miša“ voditelja prof.dr.sc. S. Gajovića. Područja istraživanja su joj razvojna genetika i neurogenetika miša, te stanična signalizacija. Autorica je 3 znanstvena rada, od toga 2 rada indeksirana u CC, te 15 kongresnih sažetaka. Marija Ćurlin sudjelovala je u nastavi iz sljedećih predmeta na dodiplomskom studiju medicine: „Histologija i embriologija“, „Biologija stanice“ i „Prije nego što smo se rodili“, zatim predmeta „Histologija“ za studente Visoke zdravstvene škole u Zagrebu, „Ciljena promjena genoma sisavaca“ za studente poslijediplomskog studija na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, te „Morfološke metode istraživanja u stomatologiji“ za studente Poslijediplomskog studija na Stomatološkom fakultetu u Zagrebu. Članica je Hrvatskog biološkog društva, Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog društva za elektronsku mikroskopiju, Hrvatske udruge genetičkih inženjera, te Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama.