



Središnja medicinska knjižnica

Žižić Mitrečić, Marica (2012) *Uloga gena Noto u razvoju kaudalnog notokorda u zametku miša [The role of Noto in development of the caudal part of notochord in mouse embryo]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/1604>

University of Zagreb Medical School Repository

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Marica Žižić Mitrečić

**Uloga gena *Noto* u razvoju kaudalnog
notokorda u zametku miša**

DISERTACIJA



Zagreb, 2012.

**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

ZAHVALA

Zahvaljujem voditelju rada prof. dr. Srećku Gajoviću koji me uveo u svijet znanosti te je svojom genijalnošću stalan izvor originalnih ideja. Njegova predanost mi je omogućila da poboljšam i pročistim svoj pristup provođenju znanstvenog rada.

Zahvaljujem stručnim prvostupnicima Sandri Grgić i Iris Šumera koji su sudjelovali u obradi tkiva i izradi histoloških preparata.

Posebno zahvaljujem svom dugogodišnjem suradniku i suprugu Dinku, iskonskom zaljubljeniku u znanost, koji je svojom ljubavlju, stabilnošću i optimizmom pomogao da s lakoćom i radošću nađem odgovore i na najzahtjevnija znanstvena pitanja.

Zahvaljujem i ostalim članovima svoje obitelji: kćeri Lauri Dini, bratu Zvonimiru, ocu Ivici, a najviše majci Ivanki, kojoj ovu disertaciju i posvećujem. Ona je od mojih prvih koraka poticala želju za učenjem. Njena nesebična ljubav i snaga su moja trajna inspiracija za svaki novi dan.

SADRŽAJ

Popis kratica.....	7
1. UVOD.....	8
1.1. Razvoj kaudalnog dijela zametka.....	8
1.1.1. Sekundarni mehanizam razvoja.....	8
1.2. Primarni i sekundarni razvoj notokorda.....	10
1.3. Gen <i>Noto</i>	13
1.4. Zelena fluorescentna bjelančevina.....	14
1.5. Mišja linija <i>Noto</i> ^{eGFP}	16
2. HIPOTEZA, CILJ I SVRHA RADA.....	18
3. UZORCI I POSTUPCI.....	19
3.1. Postupci sa životinjama.....	19
3.1.1. Žrtvovanje životinja u svrhu dobivanja zametaka.....	19
3.1.2. Određivanje stadija zametaka.....	20
3.1.3. Izolacija zametaka i priprema tkiva za morfološku analizu.....	20
3.1.4. Genotipizacija zametaka.....	22
4. REZULTATI.....	24
4.1. <i>Noto</i> ^{eGFP} zameci stari 11,5 dana su obilježeni nepravilno oblikovanim i isprekidanim notokordom te poremećenom građom neuralne cijevi i somita.....	24
4.2. <i>Noto</i> ^{eGFP} zameci stari 12,5 dana imaju izrazito poremećen sekundarni mehanizam razvoja.....	29

4.3. Izražaj i uloga gena <i>Noto</i> može se istražiti korištenjem GFP konstrukta.....	34
4.3.1. Gen <i>Noto</i> je izražen u stanicama repnog pupoljka normalnih zametaka te je pomoću <i>Noto-GFP</i> konstrukta moguće pratiti nastanak i kontinuitet sekundarnog notokorda.....	35
4.3.2. Poremećen razvoj notokorda u <i>Noto^{eGFP}</i> homozigota povezan je s poremećenom diferencijacijom repnog pupoljka.....	37
4.4. Repni pupoljak sadrži stanice koje izražavaju biljege pluripotentičnosti.....	41
4.4.1. Repni pupoljak izražava biljeg pluripotentičnosti <i>Oct4</i>	41
4.4.2. Izražaj <i>Sox2</i> prisutan je u ventralnom dijelu sekundarne neuralne cijevi.....	43
5. RASPRAVA.....	45
5.1. Uzrok specifičnog <i>Noto^{eGFP}</i> fenotipa je u pogrešnoj podjeli stanica na razini repnog pupoljka te u njihovoj poremećenoj diferencijaciji.....	45
5.1.1. <i>Noto^{eGFP}</i> zamci imaju poremećen razvoj notokorda.....	45
5.2. Gen <i>Noto</i> je specifičan biljeg kaudalnog dijela notokorda.....	46
5.2.1. Gen <i>Noto</i> je izražen na razini repnog pupoljka.....	47
5.2.2. Kaudalni dio notokorda razvija se od stanica u središnjem dijelu repnog pupoljka.....	48
5.3. Produljivanje primarnog notokorda i nastanak sekundarnog repnog notokorda su dio istog morfogogenetskog zbivanja.....	48

5.4. Repni pupoljak je pluripotentna struktura.....	51
6. ZAKLJUČCI.....	54
7. SAŽETAK.....	56
8. SUMMARY.....	57
9. POPIS LITERATURE.....	58
10. ŽIVOTOPIS.....	64

POPIS KRATICA

B6 - C57BL/6NCrl

C – repno crijevo

Foxa2 – forkhead box A2

eGFP – enhanced green fluorescent protein, pojačana zelena fluorescentna bjelančevina

GFP – green fluorescent protein, zelena fluorescentna bjelančevina

Noto – notochord homolog

Oct4 - octamer-binding transcription factor 4

P – repni pupoljak

S – somiti

Sox2 – sex determining region Y-box 2

T – repni tračak

T – gen brachyury

1. UVOD

1.1. Razvoj kaudalnog dijela zametka

Razvoj kaudalnog dijela miša započinje kada je zametak star 8,5 dana. Nakon što nestane primitivna pruga, čime je označen kraj gastrulacije, počinje se oblikovati repni nabor. U dan starijih zametaka, 9,5 dana starih (Theilerov stadij 16, 30-35 somita), pojavljuje se osnova repa (kaudalna eminencija) (1). Nakon što se pojavi osnova repa, kaudalni dio zametka se nastavlja intenzivno produljivati te dolazi do nastanka novog tkiva u tom području. Upravo se na tom stadiju počinju uočavati razlike u nastanku kranijalnog i kaudalnog dijela zametka te se pojavljuju dva različita principa zbivanja u razvoju zametka. Za razliku od kranijalnog dijela zametka koji se razvija putem zametnih listića nastalih gastrulacijom, zbog čega takav način razvoja nazivamo primarnim ili indirektnim, nastanak kaudalne eminencije i struktura koje se u njoj razvijaju odvija se na specifičan način (2-5). Osnovno obilježje razvoja kaudalnog dijela zametka je pojava nediferenciranih stanica u samom kaudalnom vrhu zametka koju nazivamo repni pupoljak. Repni pupoljak predstavlja skupinu nediferenciranih stanica mezenhima koje su ishodište svih struktura u kaudalnom dijelu zametka. Pretpostavka je da su stanice repnog pupoljka pluripotentne, odnosno da njihovom diferencijacijom nastaju sva tkiva u kaudalnom dijelu zametka. Tako se i notokord u tom dijelu (sekundarni, repni notokord) razvija diferencijacijom repnog pupoljka (2,4,5).

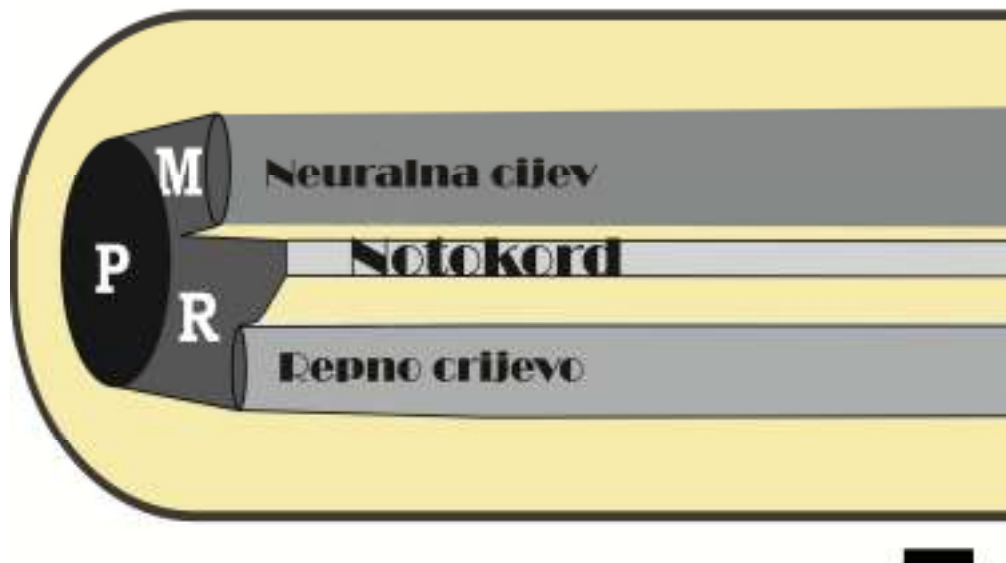
1.1.1. Sekundarni mehanizam razvoja

Nakon što je njemački znanstvenik Holmdahl 1925. godine na zametku pileta prvi uočio vezu kaudalnog dijela zametka i nediferenciranog mezenhima repnog tračka, predložen je model tzv. sekundarnog mehanizma razvoja zametka (Holmdahl) (6). Po tom modelu sve strukture koje nastaju nakon

završene gastrulacije svoje ishodište imaju u nediferenciranom mezenhimu repnog pupoljka.

Repni pupoljak predstavlja skupinu mezenhimskih stanica koje potječu od ostataka primitivne pruge i primitivnog čvorića te stanica iseljenih iz kaudalnog dijela neuralnog žlijeba i kaudalnog dijela mezodermalnog celomskog epitela (7). Iz repnog pupoljka razvijaju se dvije skupine stanica: dorzalna – **moždinski tračak** i ventralna – **repni tračak** (2-5). Diferencijacijom moždinskog tračka nastaje **sekundarna neuralna cijev**, a repni tračak se podijeli na dorzalnu nakupinu stanica od koje će nastati **notokord** te na ventralnu od koje se formira **repno crijevo**. Diferencijacijom repnog pupoljka oblikuju se tri aksijalne strukture repa: neuralna cijev, notokord i repno crijevo, dok se paraaksijalno razvijaju somiti (2-6).

Za razliku od Holmdahlovog modela, Pasteels je 1943. godine (7) postavio teoriju po kojoj se kaudalni dio zametka razvija kao produžetak struktura nastalih gastrulacijom. Za razliku od Holmdahlovog modela kojeg su podržali rezultati istraživanja rađenih na zamecima štakora (2,3), miša (4) te dokaz prisutnosti multipotentnih stanica u repnom pupoljku (8-10), Pasteelsov je model podržan istraživanjima izražaja gena koja su pokazala da repni pupoljak nije homogena tvorba (11-13). Iako je pokazano da je repni pupoljak građen od stanica s pluripotentnim potencijalom (14-17), repni pupoljak ipak nije homogeni blastem, nego je podijeljen ograničenim domenama genske ekspresije (12).



Slika 1: Shema sagitalnog presjeka kroz kaudalni dio B6 zametka starog 11,5 dana

Slika 1:

Shema sagitalnog presjeka kroz kaudalni dio zametka B6 miša starog 11,5 dana. U kaudalnom vrhu zametka se nalazi mezenhim repnog pupoljka (P) koji se prema kranijalno dijeli na dorzalni, moždinski (M) i na ventralni, repni (R) tračak. Moždinski tračak predstavlja osnovu sekundarne neuralne cijevi, dok se od repnog tračka razvijaju notokord i repno crijevo. Prilagođeno prema (4).

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, R – repni tračak. Crta mjerila – 50 μm .

1.2. Primarni i sekundarni razvoj notokorda

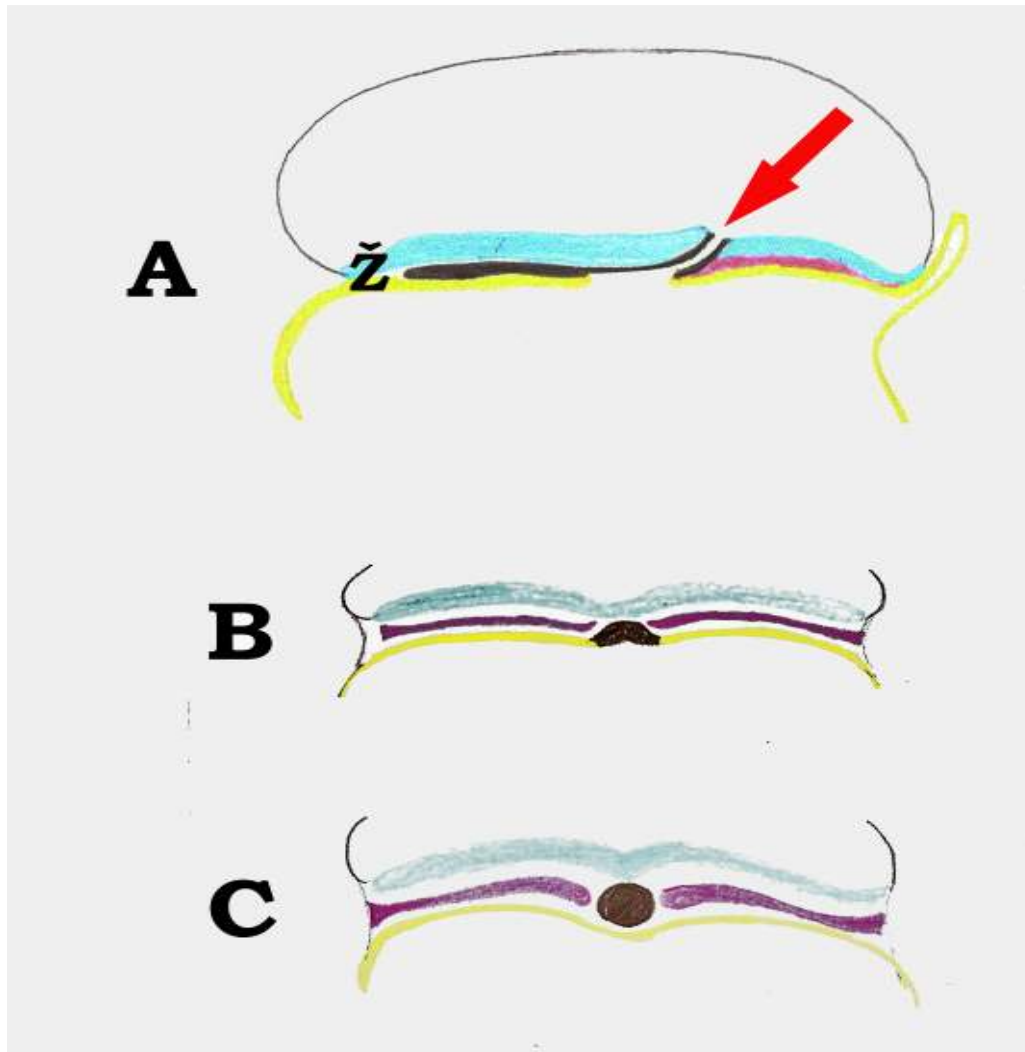
Notokord (svitak, chorda dorsalis) je aksijalna struktura zametka svitkovaca (koji uključuju i kralješnjake) koja predstavlja njegov prolazni skelet (1). Čvrstoćom notokorda omogućen je rast zametka u duljinu. U viših kralješnjaka prisutan je samo tijekom razvoja zametka, a njegova važna uloga tijekom razvoja je indukcija razvoja neuralne cijevi. Notokord izlučuje signalne molekule te na taj način regulira diferencijaciju, rast i oblikovanje okolnih tkiva

(1,18). U odraslih jedinki njegovi ostaci su prisutni kao nucleus pulposus intervertebralnih diskova, dok je u nižih kralješnjaka trajna struktura (19,20).

Tijekom gastrulacije primarni notokord nastaje iseljavanjem i migracijom stanica epiblasta koje prolaze kroz primitivni čvorić smješten na kranijalnom kraju primitivne pruge (1). Ove stanice se iseljavaju prema kranijalno dok ne dosegnu prekordalnu ploču, trajni spoj ektoderma i endoderma. Na početku, zajedno sa stanicama hipoblasta, notokord čini krov budućeg primitivnog crijeva, no kako se hipoblast zamjenjuje novostvorenim endodermom, notokord postaje odvojen tračak stanica. Ovaj tračak se na tom stupnju razvoja pruža od primitivnog čvorića do orofaringealne membrane, nastale od prekordalne ploče. Stanice iseljene iz epiblasta postupno se pridodaju stanicama notokorda u razvoju pa se notokord produžuje prema kaudalnom kraju zametka. Tijekom kranio-kaudalnog savijanja zametka i stvaranjem nabora glave, savija se i kranijalni dio notokorda. Kranijalni dio notokorda ima važnu ulogu pri indukciji i stvaranju kostiju baze lubanje i hipofize, dok srednji i kaudalni dio notokorda indukcijskim signalima sudjeluje u razvoju i diferencijaciji neuralne cijevi, primitivnog crijeva i njegovih derivata, te sklerotoma koji će stvoriti kosti kralježnice.

Notokord je odličan primjer u embriologiji koji pokazuje kako za istu strukturu u različitim dijelovima tijela vrijede različiti morfogenetski principi. Analiza uzoraka genske ekspresije predložila je tri dijela notokorda koji bi odgovarali trima različitim načinima nastanka notokorda: notokord glave, notokord trupa i notokord u repu (21). Naša istraživanja koja uključuju i rezultate prikazane u ovom doktoratu ukazuju na četvrti način nastanka notokorda koji odgovara sekundarnom razvoju notokorda iz mezenhima repnog pupoljka (2,4,5). U kaudalnom dijelu zametka notokord se razvija od središnjeg dijela repnog pupoljka (2,4,5). Stanice repnog pupoljka udružuju se u dvije nakupine stanica: moždinski tračak, smješten dorzalno, te skupinu smještenu ventralno od moždinskog tračka, nazvanu repni tračak. **Sekundarni notokord** nastaje odvajanjem tračka stanica od dorzalnog dijela repnog tračka, čiji ostatak predstavlja osnovu za repno crijevo. Novostvorene stanice imaju značajke istovjetne onima koje ima primarni notokord u tijelu zametka: velike

međustanične prostore, proširene cisterne Golgijevog aparata, mitohondrije u uskom kontaktu s cisternama hrapave endoplazmatske mrežice te velike nakupine glikogena.



Slika 2:

A) Shema zametka – sagitalni prikaz: notokord nastaje od stanica epiblasta koje migriraju kroz primitivni čvor (crvena strelica) i naseljavaju se u kranio – kaudalnom slijedu počevši od ždrijelne membrane (Ž). B) Frontalni prikaz prolazne faze tijekom koje je notokord (crna struktura) u kontaktu sa endodermom (sloj žutih stanica). C) Definitivni primarni notokord se odvoji od endoderma i kao samostalna struktura smješta između ektoderma (plavo), mezoderma (ljubičasto) i endoderma (žuto). Prilagođeno prema (1).

1.3. Gen *Noto*

Gen *Noto* u miša pripada homeobox skupini gena koja je odgovorna za razvoj aksijalnog skeleta. Homologni geni postoje u vinskoj mušici (*Ems*) (22), riba (*Fih*) (23), vodozemaca (*Xnot*) (24) i ptica (*Gnot*) (25). U čovjeka je gen *Noto* identificiran na drugom kromosomu, no do sada nije pronađen fenotip koji bi bio posljedica mutacije gena *Noto*.

U miša, *Noto* je eksprimiran u primitivnom čvoriću i u kaudalnom dijelu notokorda. Kod zametaka starih 7,5 dana gen *Noto* se izražava u području primitivnog čvorića, dok je kod 8,5 dana starih zametaka izražen u kaudalnoj polovini notokorda. Izražaj gena *Noto* možemo pratiti do 12,5 dana starosti zametka (26).

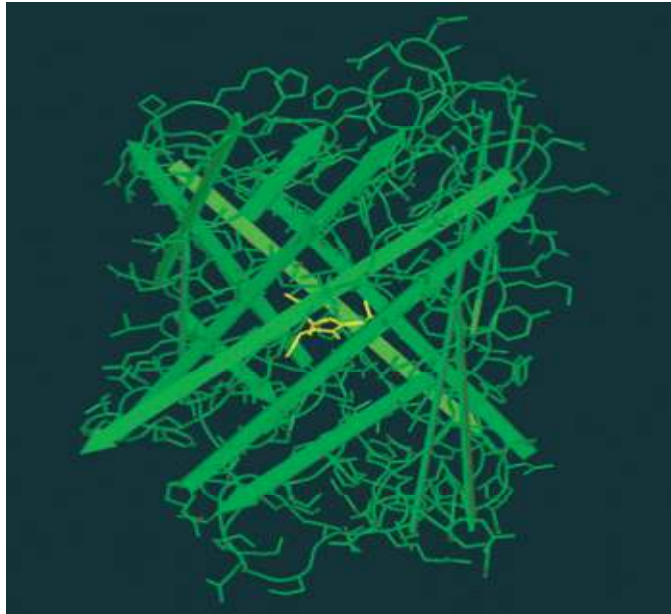
Najnovija istraživanja pokazuju da *Noto* sudjeluje u nastanku trepetljika u primitivnom čvoriću te tako doprinosi uspostavi lijevo-desne orijentacije u tijelu (27). U *Noto* mutanata lijevo-desni raspored unutrašnjih organa i izražaj markera lateralnosti su bili posljedica slučajnosti, odnosno u 50% zametaka su bili pogrešni. Trepetljike su bile kraće s izrazito nepravilnim mikrotubulima aksoneme, a bazalna tjelešca su dijelom bila smještena abnormalno duboko u citoplazmi. U mutanata je nađena smanjena ekspresija transkripcijskog faktora *Foxj1* koji regulira gen za dinein *Dnahc11*, a koji je pak potreban za ispravno sidrenje bazalnih tjelešaca trepetljika. Slično tome, transkripcijski faktor *Rfx3*, koji regulira rast trepetljika, nije bio eksprimiran u *Noto* mutanata, a drugi geni važni za funkciju ili stvaranje cilija, kao što su *Dnahc5* i *Nphp3*, imali su smanjenu ekspresiju.

1.4. Zelena fluorescentna bjelančevina

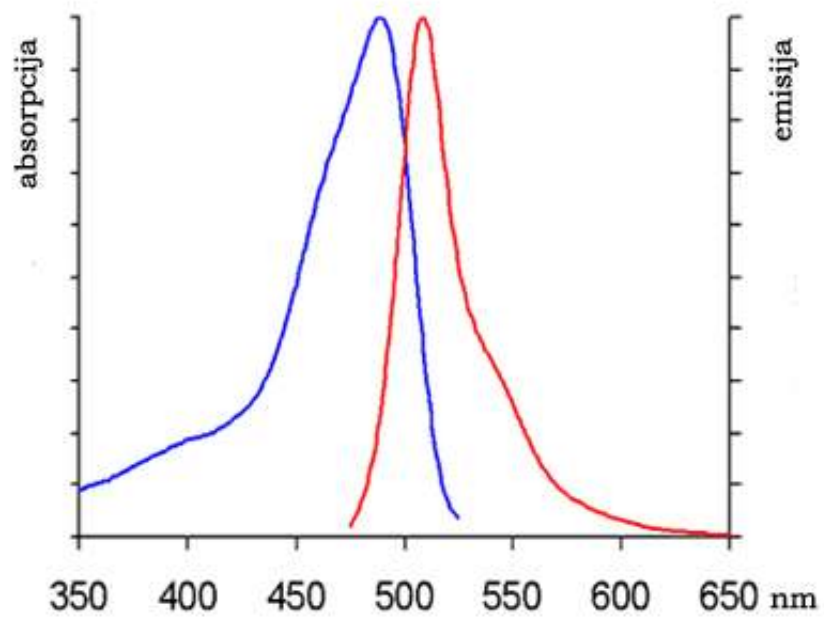
Zelena fluorescentna bjelančevina (GFP, engl. green fluorescent protein) je prvotno klonirana iz meduze *Aequorea victoria* (28). Kod pH 7.0 pobuđenje zelenog fluorescentnog proteina svjetlom valne duljine 488 nm izaziva emisiju svijetlo zelene fluorescencije s vrhom na 509 nm. Obzirom da se energija potrebna za generiranje fluorescencije može dobiti egzogenom apsorpcijom svjetla, nema potrebe za endogenim supstratom. Stoga, nakon izlaganja ekscitaciji, njena prisutnost i kretanje mogu se vizualizirati izvana, temeljeći se na fluorescenciji u stvarnom vremenu, bez potrebe za fiksacijom ili za metodama bojanja. Fiksacija paraformaldehidom ne uništava fluorescenciju zelenog fluorescentnog proteina, a mnoge vrste zelenog fluorescentnog proteina također su otporne na tretiranje etanolom. Ne postoji homolog zelenog fluorescentnog proteina u sisavaca pa stoga nema niti endogene interferencije s izazvanom fluorescencijom zelenog fluorescentnog proteina. Jedinstvena kombinacija obilježja prisutnih u ovom malom proteinu od 238 aminokiselinskih ostataka čini ga idealnim kandidatom za upotrebu kao *in vivo* izvjestitelja za čitav niz razvojnih procesa.

Pojačani zeleni fluorescentni protein (eGFP- enhanced green fluorescent protein) je mutirani oblik zelenog fluorescentnog proteina koji nudi poboljšana svojstva u odnosu na obični GFP: signal je intenzivniji i dulje vidljiv nakon fiksacije. Slijedeća prednost zelenog fluorescentnog proteina kao *in vivo* markera je u tome da se lako mogu uočiti pojedinačne stanice, zahvaljujući njegovoj jakoj emisiji fluorescencije. Ekspresija zelenog fluorescentnog proteina u živim pojedinačnim stanicama može biti vizualizirana koristeći konvencionalni fluorescentni mikroskop širokog polja sa setovima filtera za zeleni fluorescentni protein. Osim ove metode, vizualizacija je moguća i LASER scanning konfokalnom mikroskopijom (LSCM).

U ovom radu je korišten mišji model koji zajedno s mutiranim genom *Noto* ima ubačenu sekvencu za eGFP. Stoga svaka stanica koja izražava gen *Noto* može biti prepoznata temeljem prisutnosti ove bjelančevine, odnosno prisutne fluorescencije.



Slika 3 A.



Slika 3 B.

Slika 3:

Shema trodimenzionalnog izgleda bjelančevine eGFP (A) i njenog spektra (B). eGFP se najbolje pobuđuje svjetlom valne duljine 488 nm i emitira svjetlost na 509 nm. Prilagođeno prema (28).

1.5. Mišja linija *Noto*^{eGFP}

Prva saznanja o genu *Noto* dobivena su u doba kada se još nije znalo o kojem se točno genu radi. Spontano nastali mišji mutant gena *Noto* nazvan je *truncate* (tc) i opisan kao miš u kojem odrasle životinje imaju skraćen, kao odrezan rep. Osnova ovog poremećaja bio je nepravilan razvoj notokorda (4,29). U homozigotnih *truncate* zametaka notokord se normalno razvija do oko 10. dana razvoja, što korelira s pojavom mezenhima repnog pupoljka. Kod zametaka starih 11 dana uočava se suženje kaudalnog dijela repa. Sekvencioniranje zahvaćene regije na 6. kromosomu otkrilo je postojanje do tada neotkrivenog gena koji je nazvan *Noto* (26,30). Pokazano je da za fenotip *truncate* miša odgovorna točkasta mutacija koja mijenja područje prve uzvojnice *homeobox* domene bjelančevine *Noto*.

Budući da je pokazano kako *truncate* mutacija mijenja stabilnost homeodomene i izaziva djelomičnu nedjelotvornost bjelančevine, dobiven je transgениčni miš u kojem su izbačeni egzon 1 i 2, što ima za posljedicu potpuno odstranjenje homeodomene, odnosno potpunu nedjelotvornost bjelančevine. Nadalje, kako bi se omogućilo praćenje stanica koje izražavaju *Noto*, pod nadzor promotora za gen *Noto* ubačen je gen *eGFP*.



Slika 4:

Homozigotni *Noto*^{eGFP} miš. Uočava se skraćen rep, osnovno vanjsko obilježje ove linije.

2. HIPOTEZA, CILJ I SVRHA RADA

Dosadašnja istraživanja razvoja notokorda u kaudalnom dijelu zametka temeljila su se na mišjoj mutanti *truncate* i normalnim zamecima miša i štakora. Otkrićem gena *Noto* i nastankom mišje linije ***Noto*^{eGFP}** učinjen je značajan napredak u svrhu istraživanja razvoja notokorda u kaudalnom dijelu zametka.

Hipoteza ovog rada je da je poremećen razvoj notokorda koji je osnovno obilježje mišje linije kojoj nedostaje gen *Noto* uzrokovan poremećenom diferencijacijom repnog pupoljka.

Cilj ovog rada bio je odrediti ulogu novootkrivenog gena *Noto* u razvoju kaudalnog dijela notokorda.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. opisati koje stanice i na kojem stadiju izražavaju gen *Noto*
2. opisati koji je odnos izražaja *Noto* u notokordu i razvoja repnog pupoljka
3. opisati kako poremećen razvoj notokorda u mišjih mutanata za gen *Noto* utječe na diferencijaciju repnog pupoljka

3. UZORCI I POSTUPCI

U ovom radu upotrijebljeni su homozigotni i heterozigotni mišji zameci soja *Noto^{eGFP}* i odgovarajuće kontrole B6 (C57BL/6NCrl) stari 11,5 i 12,5 dana. Ukupno je žrtvovano 20 trudnih životinja, čime je dobiveno oko 120 zametaka. Svi postupci sa životinjama su rađeni po uhodanim i prihvaćenim protokolima (31).

3.1. Postupci sa životinjama

3.1.1. Žrtvovanje životinja u svrhu dobivanja zametaka

Za potrebe analize fenotipa nastalog izbacivanjem gena *Noto* korišteni su *Noto^{eGFP}* homozigotni zameci. Oni su dobiveni međusobnim parenjem homozigotnih miševa. Za potrebe analize izražaja gena *Noto* u miševa koji imaju normalan fenotip, korišteni su heterozigotni *Noto^{eGFP}* zameci. Oni su dobiveni parenjem homozigotnih *Noto^{eGFP}* miševa s miševima divljeg tipa (C57BL/6NCrl).

Nakon što su tri ženke stavljene preko noći u kavez s jednim mužjakom, svakog jutra pregledana im je rodnica i onog jutra kada je nađen vaginalni čep, životinja je proglašena skotnom. Vaginalni čep je stvrdnuta mješavina sjemene tekućine i sluzi rodnice koja se nalazi u rodnici mišice jutro nakon parenja. Budući da se miševi pare noću, jutro kada je nađen vaginalni čep odgovara početku trudnoće, a popodne toga dana odgovara 0,5 dana starosti zametka.

Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Jednom rukom se glava životinje učvrstila u nepomičnom položaju, dok se drugom rukom izveo nagli pokret povlačenja repa. To dovodi do prekida kralježnične moždine u području vrata te trenutne smrti.

3.1.2. Određivanje stadija zametaka

Dob zametka se određivala praćenjem vaginalnih čepova i prepoznavanjem vanjskih obilježja zametka. Nakon što je nađen vaginalni čep, odbrojavanjem dana je određeno kada treba žrtvovati skotnu mišicu kako bi se dobili zameci na određenom stadiju. Nakon izolacije zametaka, pažljivo su pogledani na lupi kako bi im se potvrdio stadij. Theiler stadij 19 odgovara zametku starom 11,5 dana. U tom stadiju lećni mjehurić je potpuno odvojen od površinskog epitela te je vidljiva prednja, ali ne i stražnja osnova šape. Također, vidljiv je dug rep sa repnim pupoljkom koji prosijava kroz kaudalni završetak. Zametak star 11,5 dana imao je 40-45 parova somita.

Zametak star 12,5 dana je imao više od 45 parova somita, vidljiv početak razvoja prstiju na prednjem udu te proširenje osnove šape na završetku stražnjeg uda.

3.1.3. Izolacija zametaka i priprema tkiva za morfološku analizu

Za potrebe dobivanja tkiva za analizu bilo je potrebno izolirati zametke. Skotna žrtvovana ženka je bila postavljena na kiruršku podlogu. Nakon što se dlaka premazala etilnim alkoholom, odstranila se koža s donjeg dijela trbušne šupljine, a potom i mišićna stijenka s potrbušnicom. U trbušnoj šupljini su se našli rogovi maternice sa zamecima koji su se odrezali i premjestili u hladni fosfatni pufer PBS (engl. phosphate buffered saline; 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na₂HPO₄, 0,14 mM KH₂PO₄). U puferu su rogovi maternice bili promatrani pod stereo lupom te odvojeni od svojih ovojnica. Kranijalni dio zametka bio je premješten u pufer za izolaciju DNA, dok je kaudalni dio zametka bio uronjen u fiksativ. Svim homozigotnim zamecima su kontrole bili zameci iz istog legla kojima je potvrđen genotip divljeg tipa (*B6* kontrolni zameci).

Za potrebe analize svjetlosnom mikroskopijom kaudalni dio zametka je dva sata fiksiran u 4% paraformaldehidu u 0.1 M fosfatnom puferu, nakon čega je ispran u puferu, dehidriran u uzlaznom nizu alkohola i uklopljen u Durcapan (Fluka). Takvi zametci rezani su na 1 mikrometar debele rezove okomito na uzdužnu os repa na Reichert-Jung UltracutE ultramikrotomu te bojani toluidinskim modrilom.

Za potrebe direktne analize konfokalnom mikroskopijom kaudalni dio zametka je na 20 minuta uronjen u u 4% paraformaldehid u 0.1 M PBS puferu, nakon čega je ispran u puferu. Odgovarajući komad tkiva stavljen je u kap tekućine Aquatex (Merck) i direktno vizualiziran na konfokalnom mikroskopu. Za analizu fotografija korišten je Zeiss LSM 510 Meta konfokalni mikroskop i Zeiss softver (Axio Vision 4.7.1).

Za potrebe imunohistokemijske analize kaudalni dio zametka je na 60 minuta uronjen u u 4% paraformaldehid u 0.1 M PBS puferu, nakon čega je ispran u puferu. Dehidriran je u uzlaznom nizu alkohola, uklopljen u Durcapan (Fluka) te rezan na 1 mikrometar debele rezove.

Budući da je penetracija protutijela kroz plastičnu smolu Durcapan bila značajno otežana, bilo je potrebno pronaći način kojim bi se ili odstranila smola ili povećala njena propusnost te na taj način omogućio pristup protutijela antigenu.

Prvi testirani pristup se temeljio na nagrivanju plastične smole 50% octenom kiselinom i proteolizi proteinazom K (32). Budući da rezultati nisu bili zadovoljavajući, odlučili smo promijeniti pristup i kombinirati ga s onim objavljenim od strane Groosa i suradnika (33). Taj pristup se temelji na nagrivanju plastične smole natrijevom lužinom i na pojačavanju antigena koristeći citratni pufer. Kako je drugi protokol dao zadovoljavajuće rezultate, korišten je za potrebe ovog istraživanja.

Rezovi su uronjeni u 10-50% NaOH u apsolutnom alkoholu na 30-60 minuta. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu, rezovi su premješteni u 0.01 M citratni

pufer (pH 6.0) te zagrijani do vrenja u mikrovalnoj pećnici i ostavljeni da ključaju 15-ak minuta. Nakon hlađenja u fosfatnom puferu, primijenjen je rutinski imunohistokemijski protokol: nakon ispiranja u fosfatnom puferu preparati su blokirani u 1% otopini BSA i 5% kozjem serumu 30 minuta. Primarna protutijela na zeleni fluorescentni protein (poliklonski kunić, A6455; Invitrogen), u razrjeđenju 1:200, te protutijela za Oct4 i Sox2 (oba monoklonska, Milipore, 1:400) ostavljena su preko noći, da bi se drugo jutro isprali u puferu tri puta po dvadeset minua. Kao sekundarno protutijelo korišteno je Alexa 594 (A11012; Invitrogen) u razrjeđenju 1:100. Dobiveni imunohistokemijski signali su analizirani i fotografirani koristeći Zeiss Axiovert 200 M fluorescentni mikroskop.

3.1.4. Genotipizacija zametaka

Za potrebe genotipizacije, kranijalni dio zametka stavljen je u 200 µl pufera za izolaciju DNA (engl. lysis buffer, 50 mM Tris, pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% SDS) kojem je dodana proteinaza K u konačnoj koncentraciji od 100 µg/µl. Nakon što je tkivo stajalo u puferu preko noći na 56°C, izolacija DNA je nastavljena iduće jutro kad je uzorku dodano 200 µl izopropanola. Nakon centrifugiranja od 15 minuta, izopropanol se odstranio, a DNA se isprala dva do tri puta sa 70% etilnim alkoholom. Nakon posljednjeg centrifugiranja, alkohol se odstranio, a uzorak se ostavio na sobnoj temperaturi sve dok ostatak alkohola potpuno ishlapi. Izolirana i pročišćena DNA se otopila u 100 µl sterilne vode i bila je spremna za upotrebu u reakciji lančane polimeraze.

Genotipizacija zametaka učinjena je lančanom reakcijom polimeraze (eng. PCR). Reakcija je izvedena sa slijedećim komponentama: 200 nM početnica, 1mM dNTP, 2mM MgCl, 1 U GoTaq DNA polimeraze (Promega) i 0.5 do 1 µg DNA, u ukupnom volumenu od 25 µl. Temperature reakcija su bile slijedeće: početna denaturacija 94°C 2 minute, 30 ciklusa koji sadrže denaturaciju na 94°C, 30 sekundi, ljepljenje početnica na 64°, 30 sekundi te polimerizaciju na 72°C, 1 minutu. Završna polimerizacija na 72°C trajala je 7 minuta. Reakcija se odvijala u stroju za lančanu reakciju polimerazom (GeneAmp PCR System

2400, Perkin Elmer), a rezultati lančane reakcije polimerazom očitani su elektroforezom u agaroznom gelu. Sekvence početnica su bile: NOT F - TGA CCACCTCTCTCT, NOT WT B - CCACCGCTTCCATACTGATACC i NOT GFP B - TGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC.

4. REZULTATI

4.1. *Noto*^{eGFP} zameci stari 11,5 dana su obilježeni nepravilno oblikovanim i isprekidanim notokordom te poremećenom građom neuralne cijevi i somita

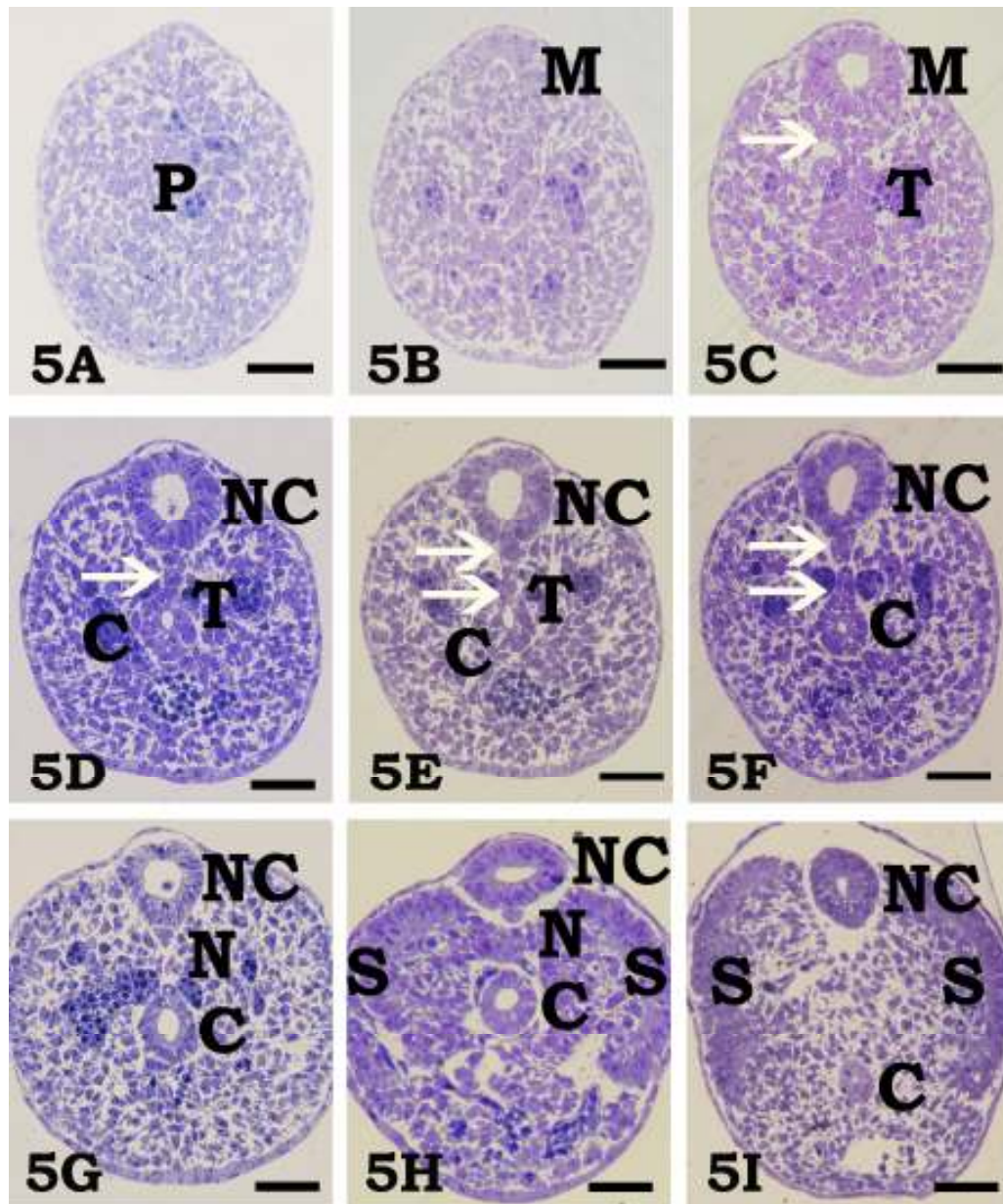
Istraživanje razvoja 11,5 dana starog *Noto*^{eGFP} zametka otkrilo je poremećaje u razvoju notokorda, neuralne cijevi i somita (sl.5). Osnovno obilježje poremećenog notokorda jest isprekidanost tijekom cijele duljine kaudalnog dijela zametka. Analiza razvoja notokorda u samom kaudalnom vrhu pokazala je da se notokord ne razvija odvajanjem od repnog tračka, kao u zametku divljeg tipa (sl.6), već nastaje kao mala skupina stanica koja se pomiče između neuralne cijevi i repnog crijeva (sl.5, strelica). Broj nađenih odsječaka tako nastalog notokorda je različit: u nekim zamecima je jedan, dok se u nekim našlo pojavljivanje nekoliko odsječaka. Nastanak svakog od tih odsječaka je vezan uz ventralni dio epitela sekundarne neuralne cijevi koji je neoštro ograničen od okoline (sl.5C-G). Tako nastali odsječci su nepravilnog oblika te se na nekim mjestima sužavaju, dok na nekim zadebljavaju. Za usporedbu, notokord nastao u zametku divljeg tipa ima pravilan oblik i građen je od stanica koje se nalaze između oštro ograničene sekundarne neuralne cijevi i repnog crijeva (sl.6H,I).

Početak nepravilnog razvoja notokorda može se pratiti sve do mjesta gdje se mezenhim repnog pupoljka diferencira u moždinski i repni tračak. Kao i u zametaka kontrolnog miša, zgusnuti mezenhim je okružen jednoslojnim pločastim epitelom (sl.5A). Prema bazi, repni se pupoljak dodatno izdužuje i dijeli na dva tračka stanica: dorzalni – moždinski i ventralni – repni tračak. Za razliku od normalnog zametka tog stadija, niti na jednom *Noto*^{eGFP} zametku nije bilo moguće odrediti gdje točno počinje notokord (sl.5C,D). Naime, istovremeno s pojavljivanjem šupljine neuralne cijevi i repnog crijeva između te dvije strukture pojavljuju se stanice udružene u jednu ili nekoliko nejasno ograničenih skupina (sl.5E,F, strelica). Dio stanica koje će oblikovati notokord

nastaju od dorzalnog dijela repnog tračka, dok dio stanica nastaje odvajanjem od ventralnog dijela neuralne cijevi. Na taj način smo uočili osnovno morfološko obilježje *Noto^{eGFP}* zametka: poremećena diferencijacija repnog i moždinskog tračka koja u konačnici dovodi do nastanka nejasno i nepravilno oblikovane skupine stanica smještene na mjestu notokorda.

Prema bazi tako nastali notokord pruža se kroz kraći ili dulji odsječak kaudalnog dijela zametka. U većini zametaka taj odsječak stanica se na nekim razinama naslanja na ventralni dio neuralne cijevi, dok se u nekim odsječcima od njega jasno odvoji pa nasloni na repno crijevo (sl.5E-G). Tako je nastanak notokorda u ovih mutanata obilježen nepravilnom diferencijacijom, oblikom i smještajem stanica notokorda.

Prateći završni kaudalni odsječak notokorda, nađeno je da se kaudalni kraj notokorda nastavlja u malu skupinu stanica prisutnu između šupljine repnog crijeva i neuralne cijevi. U većini zametaka ta skupina stanica se postepeno smanjivala i na kraju iščezla (sl.5I). Za usporedbu, u zametaka divljeg tipa kaudalni notokord je pravilno oblikovana struktura koja se nastavlja na notokord u tijelu zametka (sl.6I).



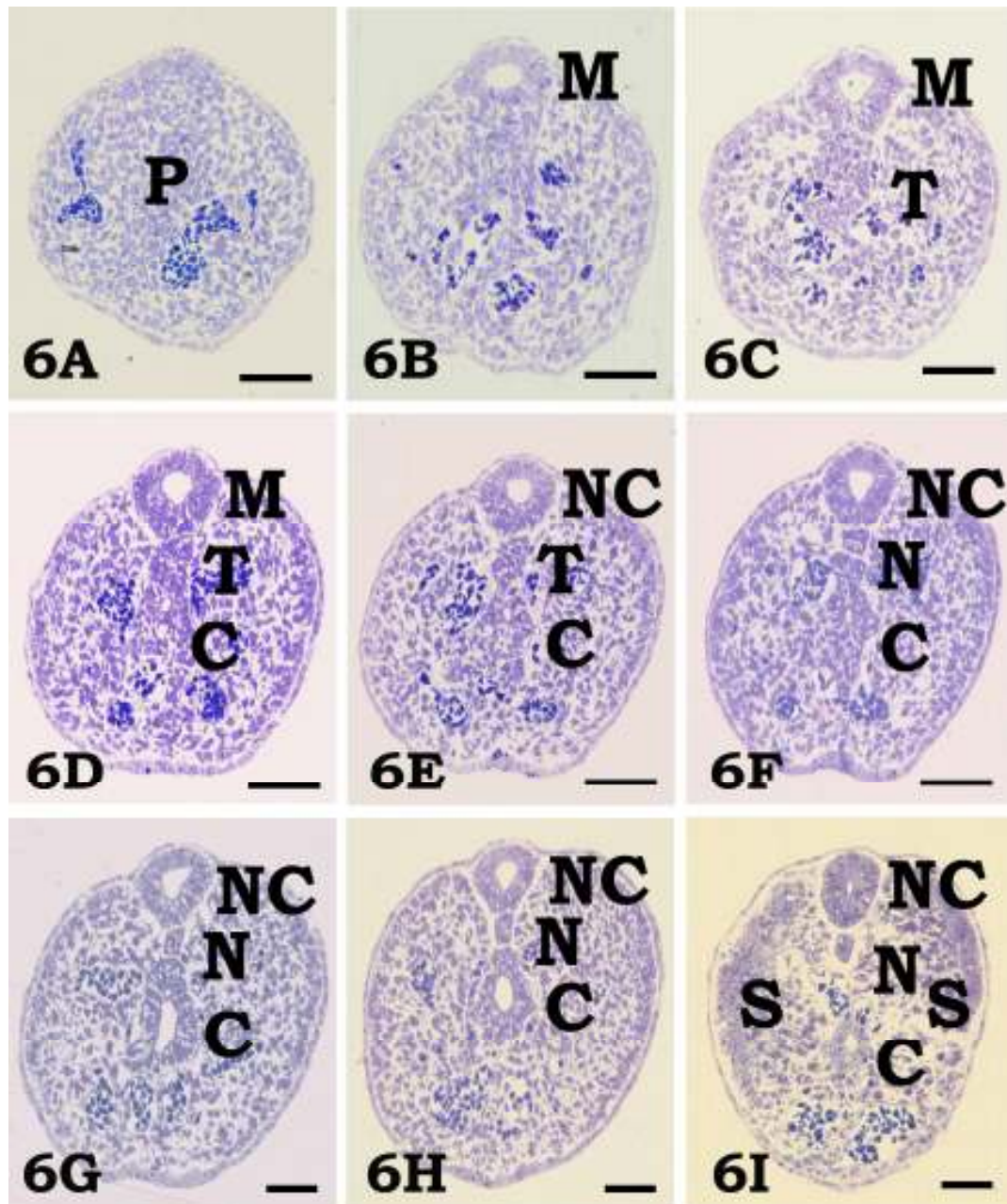
Slika 5: *Noto*^{eGFP} zametak star 11,5 dana

Slika 5: Poprečni serijski rezovi kroz osnovu kaudalnog dijela *Noto*^{eGFP} zametka starog 11,5 dana prema kranijalno.

U vrhu osnove repa nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Dalje prema kranijalno, jednako kao i u *B6* zametka, u dorzalnom dijelu osnove repa uočava se otvaranje lumena moždinskog tračka (M). U idućim odsječcima repa dolazi do oblikovanja repnog tračka (T), te otvaranja lumena repnog crijeva (C) u ventralnom dijelu repnog tračka. Za razliku od *B6* zametka, ne dolazi do jasnog oblikovanja notokorda, već se

oblikuju dvije skupine stanica (strelice). Dorzalna skupina stanica je nastala odvajanjem od neuralne cijevi, dok je ventralna nastala odvajanjem od repnog tračka (sl.5E,F). Dalje prema kranijalno, obje skupine stanica nestanu, bliže vrhu repa nestane ventralna, dok dorzalna nestane nešto bliže bazi repa. U idućem kranijalnom odsječku, kaudalni dio zametka nema notokord (sl.5I).

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, T – repni tračak, C – repno crijevo, strelica – oblikovanje notokorda, NC – neuralna cijev, N – notokord, S – somiti. Crta mjerila – 100 μ m.



Slika 6: B6 zametak star 11,5 dana

Slika 6: Poprečni serijski rezovi kroz osnovu kaudalnog dijela B6 zametka starog 11,5 dana prema kranijalno.

U vrhu osnove repa nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Dalje prema kranijalno, u dorzalnom dijelu se otvara šupljina koja odgovara moždinskom tračku (M). U idućem odsječku nalazimo jasno oblikovanu skupinu stanica koja odgovara repnom tračku (T), dok se u

dorzalnom dijelu i dalje prati oblikovanje moždinskog tračka (M). Na istoj razini kaudalnog dijela zametka dolazi do odvajanja dorzalnog dijela repnog tračka što dovodi do nastanka notokorda (6F,N), oblikovanja repnog crijeva u ventralnom dijelu repnog tračka (6F,C) te oblikovanja pravilnog lumena sekundarne neuralne cijevi (NC).

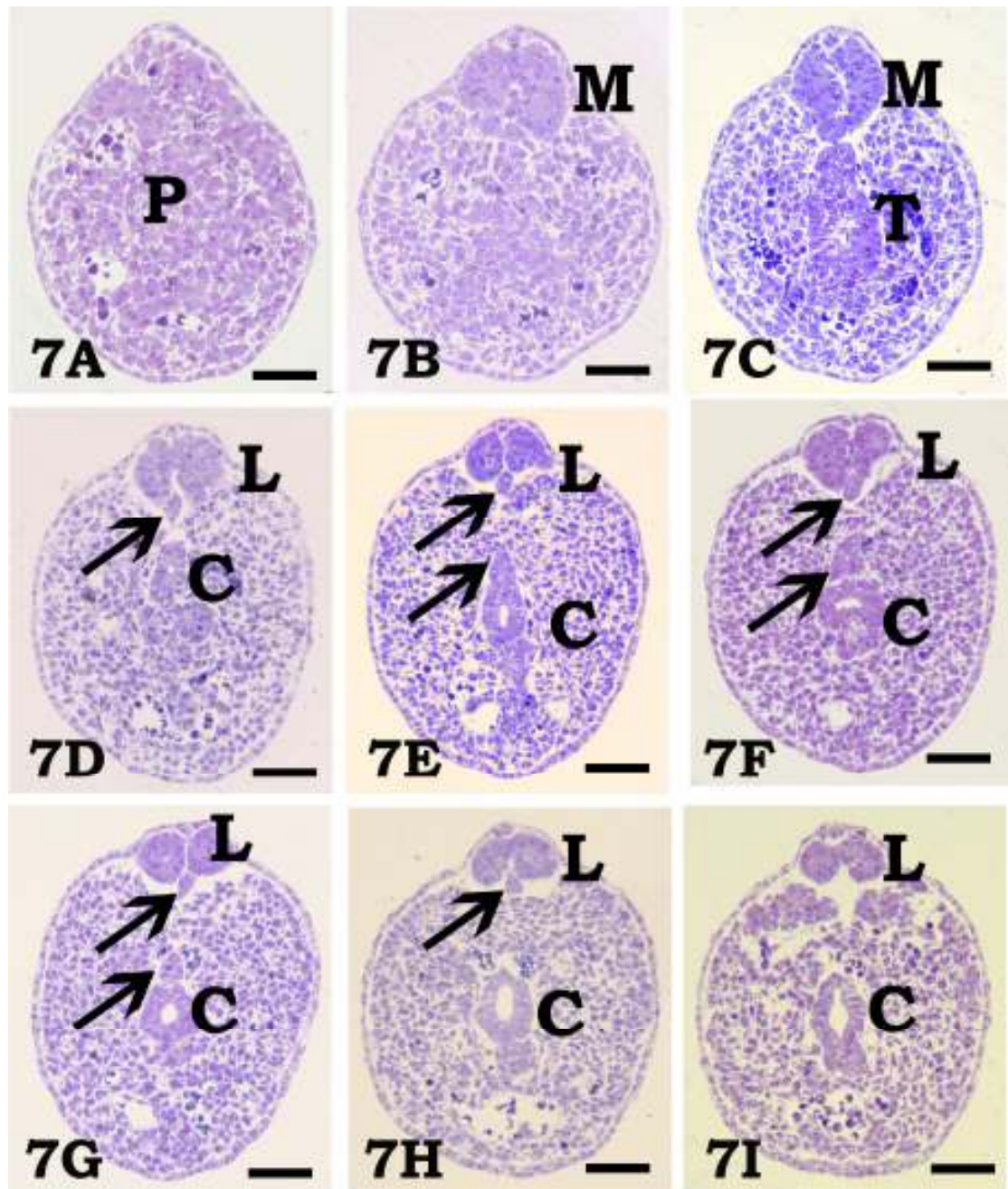
P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, T – repni tračak, C – repno crijevo, NC – neuralna cijev, N – notokord, S – somiti. Crta mjerila – 100 μ m.

4.2. *Noto*^{eGFP} zameci stari 12,5 dana imaju izrazito poremećen sekundarni mehanizam razvoja

Osnovno obilježje *Noto*^{eGFP} zametaka starih 12,5 dana jest da su promjene fenotipa jače izražene od dan mlađih zametaka. Osim poremećenog razvoja notokorda, poremećen je razvoj i neuralne cijevi te repnog crijeva.

U vrhu osnove repa zametka uočava se oblikovanje repnog pupoljka (sl.7A, P). Kao i u dan mlađih zametaka, stanice su gusto zbijene te se dobro razlikuju od okolnog rahlog mezenhima. Na rezovima prema kranijalno, uočili smo dvije skupine stanica: dorzalna je usporediva s moždinskim tračkom u dan mlađih zametaka, dok ventralna podsjeća na repni tračak (sl.7B i C, M i T). Idući dalje prema kranijalno nađena je jedna od osnovnih razlika prema dan mlađem i prema kontrolnom zametku: moždinski tračak ne oblikuje lumen sekundarne neuralne cijevi, već dolazi do nepravilnog preraspoređivanja stanica te se u većem dijelu nalazi neorganizirani raspored stanica koji podsjeća na dva lumena neuralne cijevi (sl.7D-I, L). Za usporedbu, u zametku divljeg tipa, moždinski tračak oblikuje jedan lumen sekundarne neuralne cijevi (sl. 8E-G). Na istim razinama gdje smo našli dvije skupine stanica koje podsjećaju na dvije neuralne cijevi nalazimo i treću malu skupinu ventralno od njih (sl.7D, strelica). Ta skupina stanica slična notokord koji je nastao od ventralnog neuroepitela te se ubrzo pojavljuje još jedna skupina ventralno od nje. Tako u jednom odsječku repa u 12,5 dana starih *Noto*^{eGFP} zametaka

imamo dva (pseudo)notokorda: onaj koji je nastao odvajanjem od repnog tračka i onaj koji je nastao odvajanjem od buduće neuralne cijevi (sl.7E-G). To se nikada ne vidi u zamecima divljeg tipa (sl.8F-H). Iako se na jednoj razini čini kao da će repni tračak dati skupinu stanica koja će oblikovati pravi notokord, to se ne dogodi kao u kontrolnog zametka (usporedi sliku 7F-I i 8F-I). Umjesto toga, stanice koje se odvoje od dorzalnog dijela repnog tračka ne uspijevaju zadržati stalan oblik te nestanu (sl.7H). Tako se dalje prema kranijalno obje skupine stanica koje su podsjećale na notokord postepeno smanjuju i konačno nestaju (sl.7I).

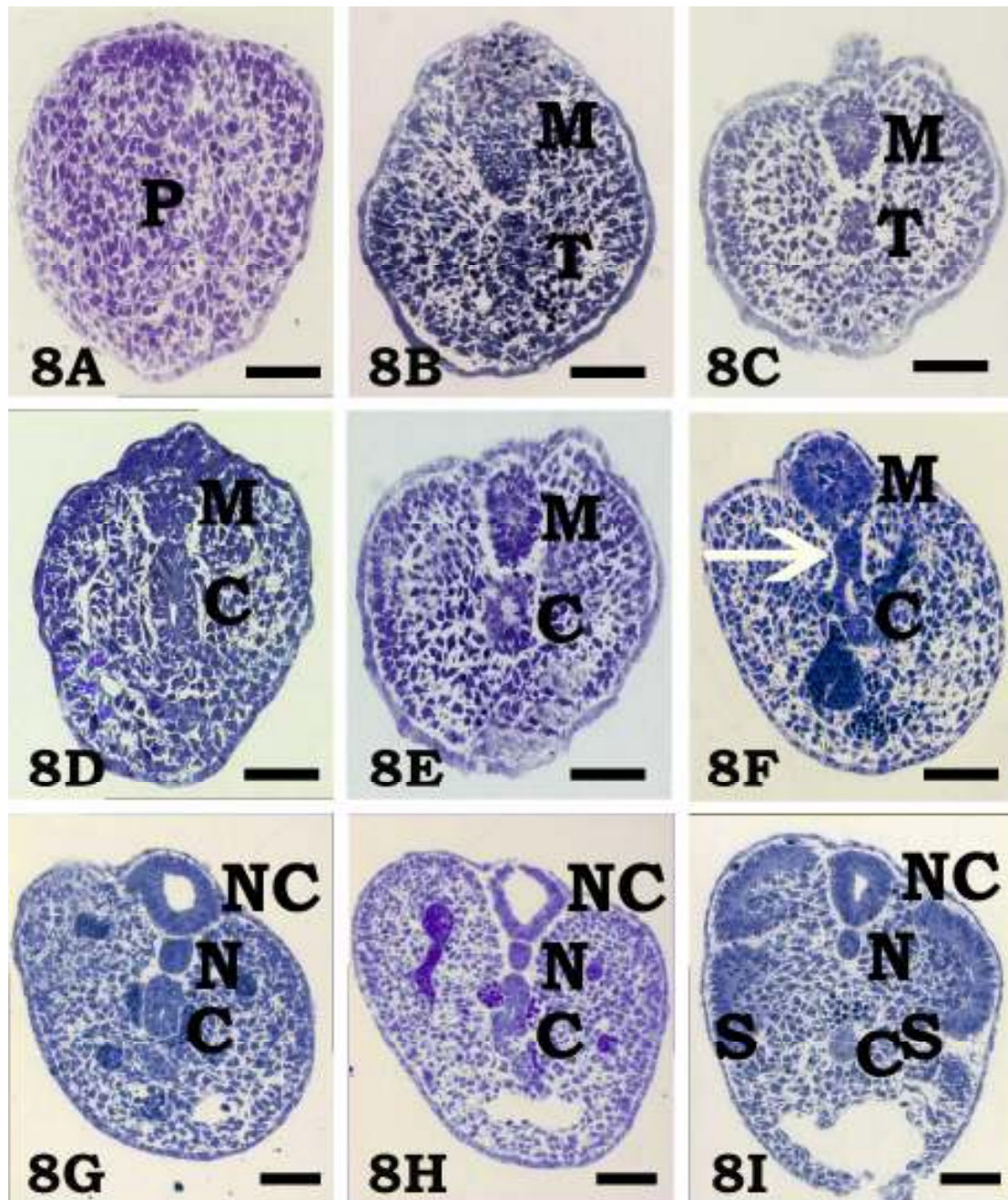


Slika 7: *Noto*^{eGFP} zametak star 12,5 dana

Slika 7: Poprečni serijski rezovi kroz osnovu kaudalnog dijela *Noto*^{eGFP} zametka starog 12,5 dana prema kranijalno.

U vrhu osnove repa nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Dalje prema kranijalno, jednako kao i u dan mlađih zametka, u dorzalnom dijelu osnove repa uočava se otvaranje lumena moždinskog tračka (M). U idućim odsječcima repa dolazi do oblikovanja repnog tračka (T) te

otvaranja lumena repnog crijeva (C) u ventralnom dijelu repnog tračka. Za razliku od dan mlađeg zametka, moždinski tračak ne oblikuje sekundarnu neuralnu cijev već se dijeli na nejasno ograničene skupine stanica (L). Na istim razinama oblikuju se dvije skupine stanica (strelice). Dorzalna skupina stanica je nastala odvajanjem od stanica koje se nalaze u području u kojem se u normalnih zametaka nalazi neuralna cijev, dok je ventralna skupina stanica nastala odvajanjem od repnog tračka. Dalje prema kranijalno, obje skupine stanica nestanu: bliže vrhu repa nestane ventralna, dok dorzalna nestane nešto bliže bazi repa. U idućem kranijalnom odsječku, kaudalni dio zametka nema notokord.



Slika 8: B6 zametak star 12,5 dana

Slika 8: Poprečni serijski rezovi kroz osnovu kaudalnog dijela B6 zametka starog 12,5 dana prema kranijalno.

U vrhu osnove repa nalazi se zgusnuće mezenhimskih stanica – repni pupoljak (P). Dalje prema kranijalno, repni se tračak dijeli na dvije skupine stanica - moždinski tračak (M) i repni tračak (T). U idućim odsječcima repa dolazi do otvaranja lumena repnog crijeva (C) te oblikovanja skupine stanica

između moždinskog tračka i repnog crijeva (strelica). Ta skupina stanica se odvoji od repnog crijeva i oblikuje notokord (N). Dalje prema bazi repa se uočava zatvaranje lumena repnog crijeva.

P – repni pupoljak, M – moždinski tračak, T – repni tračak, C – repno crijevo, strelica – oblikovanje notokorda, NC – neuralna cijev, N – notokord, S – somiti. Crta mjerila – 100 μ m.

4.3. Izražaj i uloga gena *Noto* može se istražiti korištenjem GFP konstrukta

Moderne molekularno biološke metode značajno su unaprijedile istraživanja u embriologiji. Tako je moguće označiti gen nekim reporterom te prikazati stanice koje taj gen izražavaju. Za gen *Noto* je prethodnim morfološkim analizama pokazano da je važan za razvoj kaudalnog notokorda, no, mnoga su pitanja ostala otvorena. Osnovna pitanja ove disertacije na koja smo mogli odgovoriti zahvaljujući *Noto-GFP* konstruktu bila su slijedeća:

- 1) koje stanice izražavaju gen *Noto*
- 2) ima li izražaj gena *Noto* veze sa diferencijacijom repnog pupoljka
- 3) koji je odnos poremećenog razvoja notokorda i razvoja repnog pupoljka

Kako bi odgovorili na gore navedena pitanja, nabavljena je mišja linija *Noto^{eGFP}* koja je obilježena GFP konstruktom ubačenim u gen *Noto* (poklon laboratorija prof. Achima Gosslera). Budući da se od prije zna da je *Noto* mutacija recesivna, korištenje linije *Noto^{eGFP}* omogućilo nam je dvije stvari: praćenje izražaja *Noto-GFP* konstrukta u heterozigotnih zametaka, što nam je pokazalo u kojim se stanicama i na kojem stadiju normalno pojavljuje bjelančevina Noto. S druge strane, praćenje izražaja GFP u *Noto^{eGFP}* homozigota pokazalo nam je fenotip stanica u kojima nema aktivne bjelančevine Noto. To nam je omogućilo da istražimo ulogu gena *Noto* u

normalnih zametaka te da, na osnovu opaženog fenotipa, zaključimo što se događa kada gen *Noto* nije prisutan.

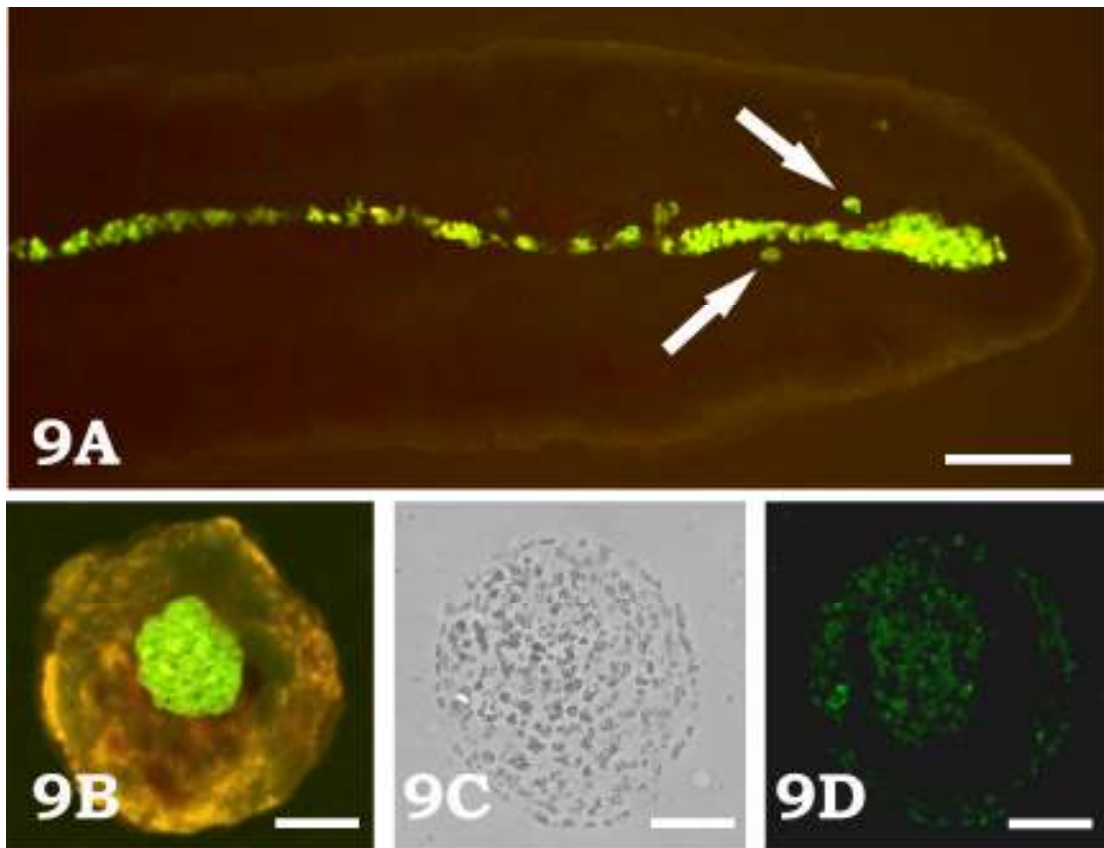
4.3.1. Gen *Noto* je izražen u stanicama repnog pupoljka normalnih zametaka te je pomoću *Noto-GFP* konstrukta moguće pratiti nastanak i kontinuitet sekundarnog notokorda

Kako bismo odredili koje stanice u razvoju kaudalnog dijela zametka izražavaju gen *Noto*, izolirani su 11,5 i 12,5 dana stari heterozigotni zameci. Analiza izražaja gena *Noto* napravljena je na razini cijelih zametaka, koristeći jaku flouescenciju gena GFP (sl. 9A,B) te na razini imunoflouescencije na polutankim rezovima (sl. 9D).

Razvijeni postupak prikazivanja izražaja GFP nam je omogućio da uočimo kako se u normalnih (*Noto*^{eGFP} heterozigotnih) zametaka stanice koje izražavaju *Noto* nalaze u kaudalnom vrhu zametka, odnosno u području koje odgovara repnom pupoljku. To je pokazano na sagitalnim (sl. 9A) i poprečnim presjecima (sl. 9B) te na imunohistokemiji repnog pupoljka (Sl. 9D).

Sagitalni presjeci (sl.9A) te serijski poprečni presjeci kaudalnog dijela zametka (sl.10) omogućili su da pomoću prikaza flouescencije GFP pratimo nastanak i neprekinut niz stanica koji je odgovarao notokordu. Te stanice su kretale gotovo iz samom vrha kaudalnog dijela zametka te su se nastavljale sve do u pred spoj osnove repa i trupa zametka.

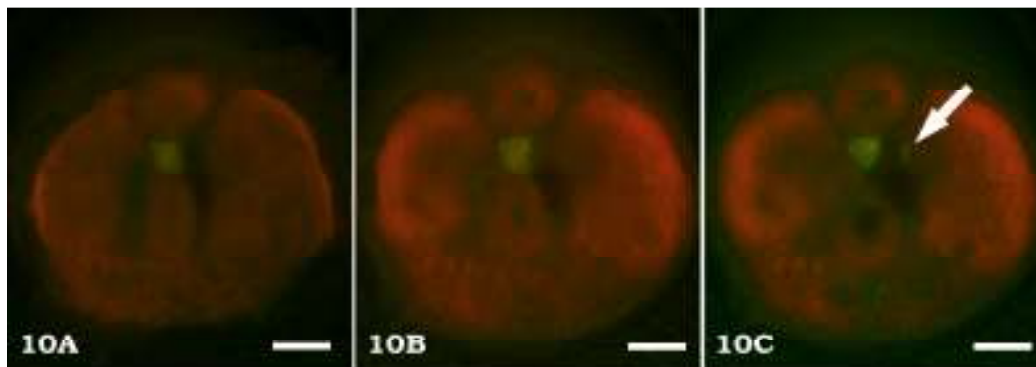
Jedan mali dio stanica koje su izražavale gen *Noto* u *Noto*^{eGFP} heterozigotnih zametaka se nalazio sa strane notokorda. Analiza na polutankim rezovima je pokazala da se radi o stanicama koje su se našle u području gdje se odvija somitogeneza (sl.9 i 10, strelice).



Slika 9: Prikaz eGFP u *Noto^{eGFP}* heterozigotnog zametka

Slika 9: Vizualizacija izražaja gena *Noto* u *Noto^{eGFP}* heterozigotnog zametka starog 11,5 dana pomoću gena reportera GFP. **9A.** Sagitalni presjek cijele osnove repa vizualizirane konfokalnim mikroskopom. Vidljivo je kako je izražaj gena *Noto* visoko specifičan za kaudalni notokord i kako doseže do kaudalnog završetka zametka, odnosno ulazi u područje repnog pupoljka. Tek pokoja pojedinačna stanica (strelice) izražava gen *Noto*, a ne pripada notokordu, već se nalazi u području diferencijacije somita. **9B.** Poprečni presjek osnove repa vizualizirane konfokalnim mikroskopom. Vidljivo je kako fluorescencija *Noto-GFP* reporter gena postoji u području repnog pupoljka. **9C.** Neobojani polutanki rez kroz područje repnog pupoljka. **9D.** Imunohistokemijsko bojenje polutankog reza poprečno presječenog područja repnog pupoljka. Kao i kod direktne vizualizacije GFP signala, vidljivo je kako su GFP pozitivne stanice prisutne u kaudalnom završetku *B6* zametka starog 11,5 dana.

P – repni pupoljak, strelica – GFP pozitivne stanice koje se nalaze u području somita. Crta mjerila – 100 μ m.



Slika 10: eGFP stanice u *Noto*^{eGFP} heterozigotnom zametku

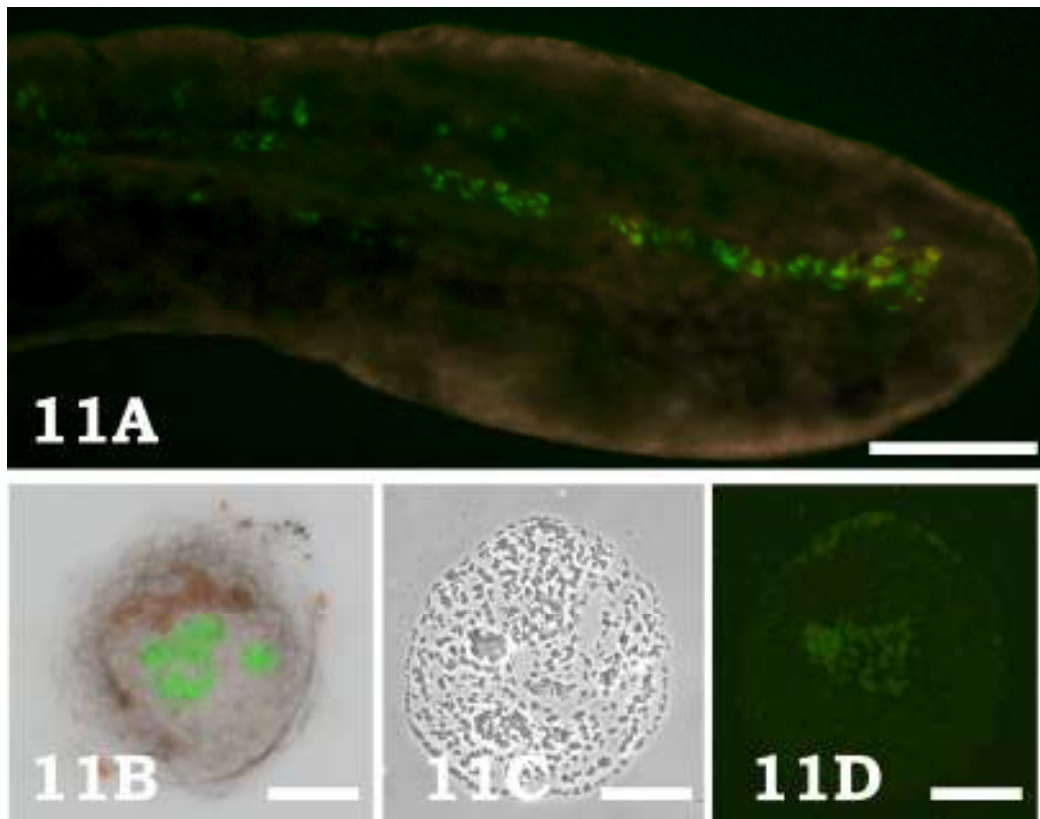
Slika 10: Vizualizacija izražaja gena *Noto* u *Noto*^{eGFP} heterozigotnog zametka starog 11,5 dana pomoću gena reportera GFP. Serijski poprečni rezovi kroz osnovu repa *Noto* heterozigotnog zametka starog 11,5 dana vizualizirani konfokalnom mikroskopijom otkrivaju da je tijekom oblikovanja repnog tračka i nastanka notokorda moguće pratiti izražaj *Noto* u dorzalnom dijelu repnog tračka. Također, GFP pozitivne stanice koje nisu u području notokorda su identificirane kao dio somita u oblikovanju.

4.3.2. Poremećen razvoj notokorda u *Noto*^{eGFP} homozigota povezan je s poremećenom diferencijacijom repnog pupoljka

Analiza izražaja gena *Noto* u homozigotnih zametaka je pokazala da se izražaj gena *Noto* također može pratiti do vrha zametka (sl.11). Jedna od osnovnih razlika između *Noto* heterozigotnih i homozigotnih zametaka bila je u uzorku izražaja u samom kaudalnom vrhu zametka: iako stanice koje izražavaju gen *Noto* postoje i u samom vrhu zametka, one nisu oblikovale homogenu skupinu već su bile nepravilno raspoređene po mezenhimu repnog pupoljka (sl.11B i D). Drugim riječima, iako se na toludinskim rezovima mezenhim repnog pupoljka ne razlikuje između heterozigotnih i homozigotnih zametaka (usp. 7A i 8A), uzorak izražaja gena *Noto* bio je značajno drugačiji (usp. 9B i 11B).

Analiza sagitalnog presjeka kaudalnog dijela zametka pokazala je da su se u homozigotnih zametaka stanice koje izražavaju *Noto* uglavnom nalazile u središnjoj ravnini koja je odgovarala području notokorda. Notokord je bio isprekidan te se moglo prepoznati nekoliko odsječaka (sl.11A). Proces nastanka sekundarnog notokorda mogao se pratiti i na serijskim poprečnim rezovima (sl.12). Iako je čest nalaz bilo dvostruko repno crijevo i iako je generalno izgled repnog tračka bio poremećen, stanice koje izražavaju *Noto* su se uglavnom nalazile u dorzalnog dijelu repnog tračka (sl.12C, strelica). Za razliku od heterozigotnih zametaka, stanice koje izražavaju *Noto* su se češće nalazile izvan središnje ravnine te su bile smještene u području koje su normalno naseljavale stanice koje oblikuju somite (usp. 10C i 12C, male strelice).

Dalje prema kranijalno, vizualizacija GFP na uzdužnim i poprečnim rezovima je omogućila da vidimo kako izražaj *Noto* odlično korelira sa stanicama od kojih se razvija notokord. Na taj način smo potvrdili pouzdanost i specifičnost markera *Noto* za kaudalni dio notokorda. Vizualizacija notokorda u kranijalnom dijelu zametka nije pokazala pozitivan signal, što je potvrdilo prethodni nalaz da je *Noto* izražen samo u kaudalnom notokordu.

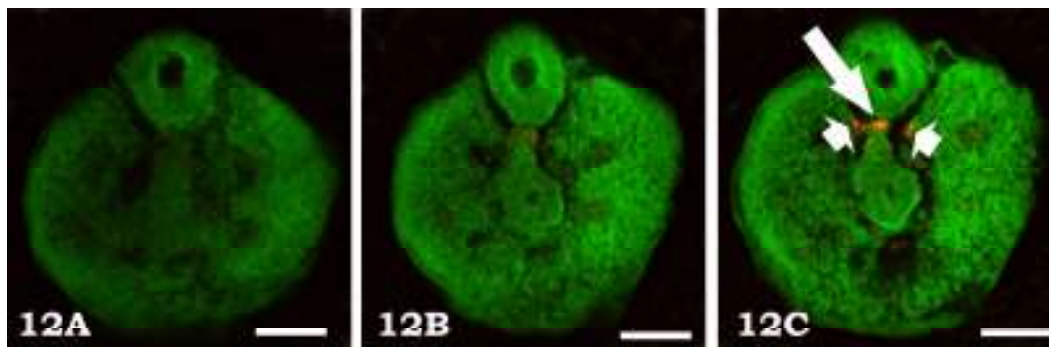


Slika 11: eGFP u *Noto*^{eGFP} homozigotnom zametku

Slika 11: Vizualizacija izražaja gena *Noto* u *Noto*^{eGFP} homozigotnog zametka starog 11,5 dana pomoću gena reportera GFP. **11A.** Sagitalni presjek cijele osnove repa vizualizirane konfokalnim mikroskopom. Vidljivo je kako je izražaj gena *Noto* isprekidan, što odgovara nalazu isprekidanog kontinuiteta notokorda na serijskim toluidinskim rezovima. Slično kao u heterozigotnog zametka, izražaj dolazi do repnog pupoljka, no stanice ne oblikuju homogenu skupinu. Također, u usporedbi sa heterozigotnim zametkom, veći je broj stanica koje izražavaju gen *Noto*, a ne pripadaju notokordu. One se nalaze u području diferencijacije somita. **11B.** Poprečni presjek osnove repa vizualizirane konfokalnim mikroskopom. Vidljivo je kako fluorescencija *Noto-GFP* reporter gena postoji u području repnog pupoljka, no za razliku od kontrolnog heterozigotnog *Noto*^{eGFP} zametka, stanice su rasute u nepovezane nakupine. **11C.** Neobojani polutanki rez kroz područje repnog pupoljka. **11D.** Imunohistokemijsko bojenje polutankog reza poprečno presječenog područja repnog pupoljka. Kao i kod direktne vizualizacije GFP signala, vidljivo je kako

su GFP pozitivne stanice u *Noto^{eGFP}* homozigotnog zametka nepravilno rasute po mezenhimu repnog pupoljka.

P – repni pupoljak, strelica – GFP pozitivne stanice koje se nalaze u području somita. Crta mjerila – 100 μ m.



Slika 12: eGFP u *Noto^{eGFP}* homozigotnom zametku

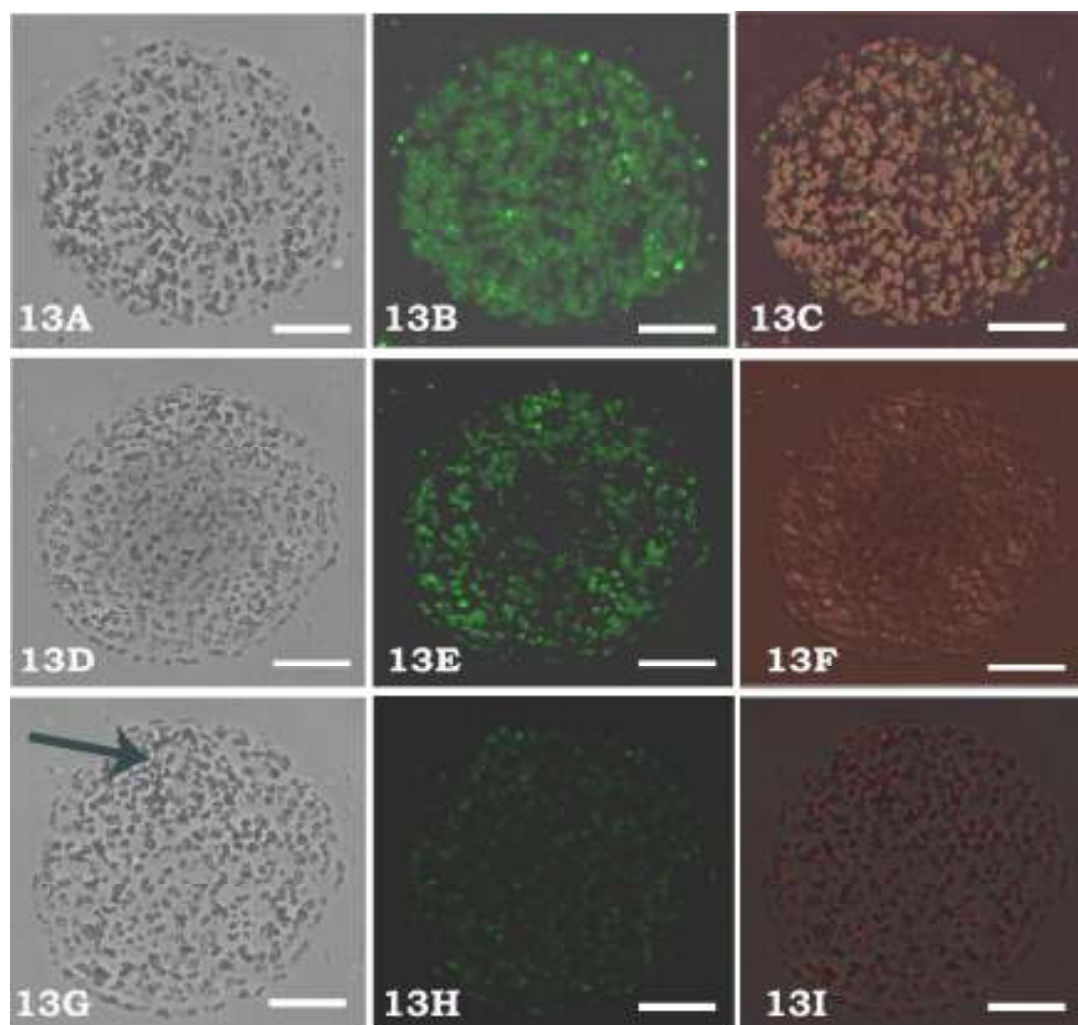
Slika 12: Vizualizacija izražaja gena *Noto* u *Noto^{eGFP}* homozigotnog zametka starog 11,5 dana pomoću gena reportera GFP. Serijski rezovi *Noto* homozigotnog zametka starog 11,5 dana analizirani konfokalnim mikroskopom otkrivaju da je tijekom oblikovanja repnog tračka i nastanka notokorda moguće pratiti izražaj *Noto* u dorzalnom dijelu repnog tračka. Iako je repni tračak poremećen i prolazno oblikuje dva lumena repnog crijeva, *Noto* pozitivne stanice su smještene u području gdje očekujemo notokord (12C, strelica). Jednako kao u heterozigotnih zametaka, samo jače izraženo, GFP pozitivne stanice koje nisu u području notokorda su identificirane kao dio somita u oblikovanju (12C, male strelice).

4.4. Repni pupoljak sadrži stanice koje izražavaju biljege pluripotencnosti

4.4.1. Repni pupoljak izražava biljeg pluripotencnosti Oct4

Kako bismo istražili je li repni pupoljak građen od stanica koje imaju pluripotencni potencijal, učinjena je imunohistokemija na polutankim rezovima s odabranim markerima. Jedan od najznačajnijih markera je gen *Oct4*. *Oct4* se koristi kao marker u prepoznavanju embrionalnih matičnih stanica koje su zadržale pluripotencnost, odnosno stanica koje mogu dati derivate sva tri zametna listića.

Imunohistokemijska analiza kaudalnog vrha zametka pokazala je da u samom vrhu postoji jaka prisutnost *Oct4* (sl.13B). *Oct4* je izražen gotovo u svim stanicama mezenhima te je jedino odsutan u stanicama epitela na površini. Zanimljivo, idući prema kranijalno, izražaj *Oct4* prvo nestaje u središnjem dijelu kaudalnog dijela zametka, što upućuje na to da stanice u rubnom području dulje zadržavaju pluripotencni potencijal (sl.13E). Dalje prema kranijalno, na razini gdje se pojavljuje rozeta buduće neuralne cijevi (sl.13G, strelica), te nazire oblikovanje repnog tračka, dolazi do naglog pada izražaja *Oct4*, što upućuje na to da su stanice u tom području već usmjerene u diferencijaciju (sl.13H).



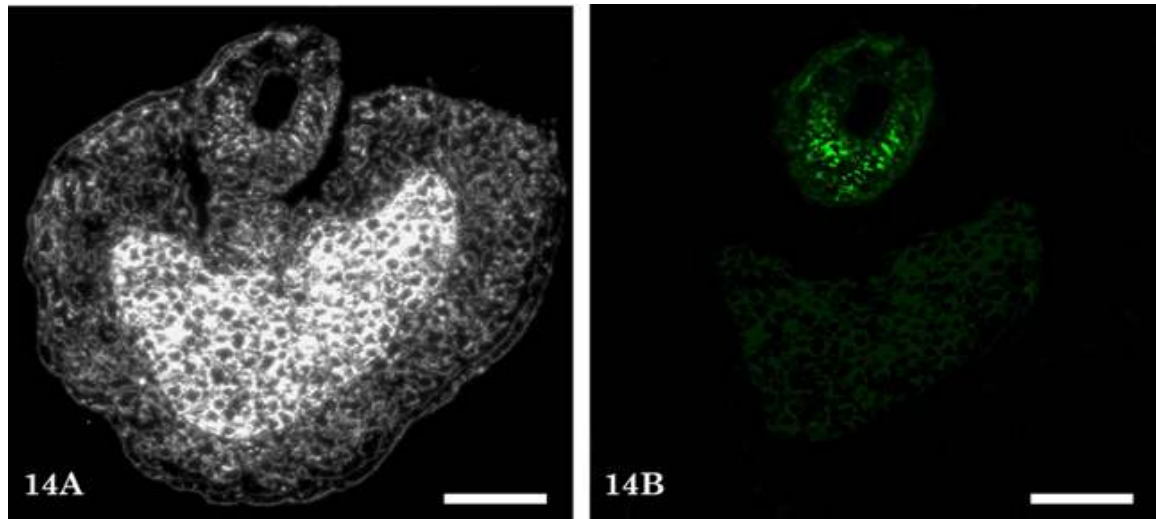
Slika 13: Izražaj Oct4 u repnom pupoljku zametka divljeg tipa

Slika 13: Polutanki rez kroz kaudalni dio kontrolnog *B6* zametka (neobojani rezovi 13A, 13D i 13G). Imunohistokemijsko bojanje kaudalnog vrha *B6* zametka biljegom *Oct4* (13B, 13E i 13H, spojene slike na 13C, 13F i 13I). Vidljivo je kako u samom kaudalnom vrhu kontrolnog zametka postoji jasan izražaj gena *Oct4* (13B). Dalje prema kranijalno, u području zgušnjavanja mezenhima, *Oct4* izražaj slabi (13E). U odsječku repa gdje počinje diferencijacija, te se nazire lumen moždinskog tračka, izražaj *Oct4* prestaje (13H).

4.4.2. Izražaj Sox2 prisutan je u ventralnom dijelu sekundarne neuralne cijevi

Kako bismo istražili da li tijekom oblikovanja neuralne cijevi u kaudalnom dijelu zametka dolazi do nastanka tkiva koje je po svojem potencijalu usporedivo s onim u kranijalnom dijelu tijekom primarne neurulacije, istražili smo izražaj markera Sox2. Sox2 je izražen tijekom neurulacije te je prisutan u ranom oblikovanju neuralne cijevi.

Za razliku od samog vrha kaudalnog dijela zametka, gdje nije nađen izražaj Sox2, u jednom kratkom odsječku kaudalnog dijela zametka, Sox2 je prisutan (sl.14). Zanimljivo, izražaj Sox2 je prvenstveno nađen u ventralnom dijelu sekundarne neuralne cijevi u oblikovanju, na razini gdje dolazi do nastanka repnog tračka. Također, čini se da izražaj nije homogen, već postoje stanice koje jasno izražavaju Sox2, one koje izražavaju slabije i one kod kojih nema izražaja. Dorzalni dio neuralne cijevi slabije izražava Sox2. Nije nađen izražaj Sox2 niti u jednoj okolnoj strukturi niti na jednoj razini kaudalnog dijela zametka.



Slika 14: Izražaj Sox2 u kaudalnom dijelu zametka divljeg tipa

Slika 14: Neobojani polutanki rez kroz kaudalni dio zametka (14A). Imunohistokemijsko bojanje kaudalnog vrha *B6* zametka biljegom Sox2 (14B). Za razliku od *Oct4*, kaudalni vrh *B6* zametka starog 11,5 dana ne izražava Sox2. Izražaj Sox2 je nađen samo u kratkom odsječku u kojem se oblikuje moždinski i repni tračak, i to uglavnom u ventralnom dijelu buduće sekundarne neuralne cijevi. Ostatak neuralne cijevi, kao i područja u kojem će se razviti somiti, notokord i repno crijevo ne izražavaju gen Sox2.

5. RASPRAVA

5.1. Uzrok specifičnog *Noto*^{eGFP} fenotipa je u pogrešnoj podjeli stanica na razini repnog pupoljka te u njihovoj poremećenoj diferencijaciji

5.1.1. *Noto*^{eGFP} zameci imaju poremećen razvoj notokorda

Osnovni poremećaj nađen u *Noto*^{eGFP} zametaka jest nepravilan razvoj kaudalnog dijela notokorda. Prateći razvoj notokorda od njegovog ishodišta, repnog pupoljka, otkriva se da se početak poremećenog razvoja nalazi već na toj razini. Umjesto da oblikuju kompaktnu gustu nakupinu stanica u središtu repnog pupoljka, kao što je to slučaj u *Noto*^{eGFP} heterozigota, GFP pozitivne stanice u *Noto*^{eGFP} homozigota su nepravilno raspoređene po repnom pupoljku. Između njih postoje stanice koje ne izražavaju gen *Noto*. Zajednička osobina 11,5 i 12,5 starih *Noto*^{eGFP} zametaka, kao i njihovih *truncate* hipomorfa, jest poremećen izgled ventralnog dijela neuralne cijevi te poremećeno odvajanje notokorda od repnog crijeva. Zanimljivo, iako bi se očekivalo da će stanice koje izražavaju gen *Noto* biti raspoređene po svim navedenim strukturama, praćenje GFP pozitivnih stanica pokazuje da se one ipak uglavnom smještaju u dorzalnog dijelu repnog tračka. To ukazuje na to da postoje geni nadređeni genu *Noto* koji su dovoljni da ove stanice smjeste na mjesto gdje bi inače morale biti. Pretpostavljamo da tu ulogu obavljaju opisani geni *T* i *Foxa2* (34-36).

S druge strane, fenotip koji nalazimo u našem istraživanju ukazuje da gen *Noto* ima važnu ulogu u oblikovanju stanica notokorda u središnjoj ravnini. Bez prisustva *Noto* bjelančevine opazili smo slijedeće poremećaje: notokord je bio isprekidan, a broj odsječaka je varirao od dva do četiri. Činjenica da je kaudalni završetak notokorda u kontaktu s poremećenim neuroektodermom ukazuje na nedostatak induktivnih signala notokorda koji su potrebni za specifikaciju područja ploče dna neuralne cijevi. Dokaz toga je znatno jače izražen poremećaj građe neuralne cijevi u 12,5 dana starih zametaka u usporedbi s dan mlađim zamecima. Iako naša analiza pokazuje da *Noto*-GFP

stanice ne sudjeluju u oblikovanju neuralne cijevi, očito je da nedostatak funkcionalnog notokorda dovodi do poremećaja sekundarne neurulacije. Kontakt notokorda i neuralne cijevi vidljiv je i u pokusima u kojima su se koristile stanice u kojima nedostaje gen *T* (44). Danas znamo da gen *T* sudjeluje u kontroli migracije stanica iz područja primitivnog čvorića u kaudalni dio zametka. Nadalje, gen *T* je nadređen genu *Noto* u njihovoj kontroli diferencijacije u notokord (34-36). Stanice koje trebaju izgraditi notokord u *Noto^{eGFP}* zametku prisutne su u području repnog pupoljka, što ukazuje da stanice primitivnog čvorića ispravno migriraju, ali im je diferencijacija poremećena.

U *Noto^{eGFP}* homozigotnih zametaka znatno veći broj stanica je nađen u području somita u odnosu na normalne zametke. Pretpostavljamo da stanice koje su izgubile signal za oblikovanje notokorda migriraju u područje sklerotoma i sudjeluju u oblikovanju somita (37,38). Takva pojava je već opisana u nekim mutantama koje zahvaćaju aksijalni skelet (39). Smatramo da raspoređivanje tih stanica u okolnom tkivu predstavlja jedan od osnovnih uzroka koji dovodi do isprekidanosti notokorda.

Stanice koje izražavaju gen *Noto* predstavljaju osnovu za nucleus pulposus intervertebralnih diskova u lumbalnom dijelu kralješnice (40). Budući da je to područje s najčešćom degeneracijom intervertebralnih diskova koja posljedično dovodi do sindroma bolnih leđa, gen *Noto* u ljudskoj populaciji bi mogao biti povezan s ovim velikim problemom modernog čovječanstva.

5.2. Gen *Noto* je specifičan biljeg kaudalnog dijela notokorda

Analiza izražaja gena *Noto* otkrila je da je kaudalni dio notokorda građen od stanica koje izražavaju taj gen. Tijekom analize direktnom vizualizacijom GFP ili imunohistokemijom na GFP nisu nađene stanice koje bi sačinjavale notokord, a da ne izražavaju gen *Noto*. Izražaj gena *Noto* je bio vrlo jak i mogao se pratiti sve do u bazu repa gdje je naglo prestao. Na taj način je pokazano da je gen *Noto* prvi otkriveni biljeg koji specifično označava notokord u kaudalnom dijelu zametka. S druge strane, u heterozigotnih, dakle

fenotipski normalnih zametaka, nađena je vrlo mala količina pojedinačnih stanica koje su izražavale gen *Noto*, a nisu se nalazile u notokordu. Te su stanice nađene u tkivu somita. Iako se radi o vrlo malom postotku *Noto* pozitivnih / ne-notokordalnih stanica može se spekulirati kako je njihova prisutnost u tkivu koje će dati tkivo kralješaka posljedica utjecaja jakih induksijskih signala koji upravljaju razvojem sklerotoma, kao što je na primjer *Pax1*. Tako je moguće da je tijekom zgušnjavanja mezenhima u kaudalnom dijelu zametka i preslagivanja stanica koje će konačno dovesti do nastanka somita jedan dio stanica koji su originalno bile predodređene da daju notokord privučen signalima kao što su *Pax1* i *Pax9*. Tako se one, iako još uvijek izražavaju *Noto*, smještaju u ravninu koja će dati osnovu za tkivo sklerotoma.

Zanimljivo je i važno uočiti kako *Noto* pozitivne stanice nisu nađene u stijenci repnog crijeva. Iako se sekundarni notokord razvija iz zajedničke osnove sa repnim crijevom, što je usporedivo sa razvojem primarnog notokorda koji je u jednoj fazi svojeg razvoja spojen sa endodermom, čini se da je gen *Noto* upravo jedan od ključnih gena koji u najranijoj fazi oblikovanja sekundarnog notokorda razgraničava stanice koje će dati notokord od onih koje će dati repno crijevo.

5.2.1. Gen *Noto* je izražen na razini repnog pupoljka

Jedan od najzanimljivijih i najvrjednijih nalaza ovog istraživanja je prisustvo izražaja gena *Noto* u samom kaudalnom mezenhimu repnog pupoljka. Budući da repni pupoljak nastaje od ostataka čvora i stanica primitivne pruge koje su migrirale u kaudalni dio zametka, ovaj nalaz se odlično uklapa u ono što znamo o genu *Noto*. Najraniji izražaj gena *Noto* je prisutan u području jamice čvora, gdje gen sudjeluje u ispravnom razvoju trepetljika (27). Očito je kako naš nalaz ukazuje na to da se može pratiti kontinuitet izražaja i uloga gena *Noto* od razdoblja gastrulacije, kada taj gen ima ulogu u oblikovanju lijevo-desne asimetrije tijela do post-gastrulacijskog razdoblja oblikovanja kaudalne eminencije, kada taj gen ima ulogu u oblikovanju sekundarnog repnog notokorda. Analizirajući vremensko prostorni kontinuitet razvoja, logično je da se stanice koje će oblikovati sekundarni notokord mogu prepoznati već u

ranoj nakupini nediferenciranog mezenhima repnog pupoljka. U skladu s ovim nalazom, bilo bi vrlo zanimljivo ponoviti neke klasične pokuse kojima se pokazala pluripotentnost stanica repnog pupoljka na način da se selektivno ispita potencijal *Noto* pozitivnih stanica u mezenhimu.

5.2.2. Kaudalni dio notokorda razvija se od stanica u središnjem dijelu repnog pupoljka

Morfološka analiza zametaka miša na stadiju 11,5 i 12,5 dana pokazala je da se kaudalni notokord odvaja od zajedničke osnove s repnim crijevom. Specifičan pristup ovom istraživanju je sadržan u činjenici da su korišteni *Noto*^{eGFP} mutanti koji su omogućili praćenje morfogenetskih zbivanja tijekom nastanka kaudalnog notokorda.

Sukladno rezultatima iz ove studije i do sada objavljenim analizama (27), čini se da različiti dijelovi čvora daju različite subpopulacije notokorda. Tako možemo predložiti model u kojem stanice prvo migriraju kroz sredinu čvora i oblikuju glavninu notokorda u središnjem dijelu tijela. Istovremeno dolazi do početka izražaja gena *Noto* na rubovima jamice, stvaranja trepetljika i gradijenta morfogena. Time se stvara prva lijevo – desna asimetrija tijela. Nakon što zametak rastom dosegne stadij kad se treba oblikovati kaudalna eminencija, a što se poklapa sa završetkom gastrulacije, dolazi do posljednjeg vala migracija stanica. Stanice koje migriraju kroz i iz primitivne jamice se naseljavaju u samom vrhu novo-oblikovanog kaudalnog završetka zametka. Time se stvara osnova građena od *Noto* pozitivnih stanica koja će izgraditi sekundarni notokord u kaudalnom dijelu zametka.

5.3. Produljivanje primarnog notokorda i nastanak sekundarnog repnog notokorda su dio istog morfogenetskog zbivanja

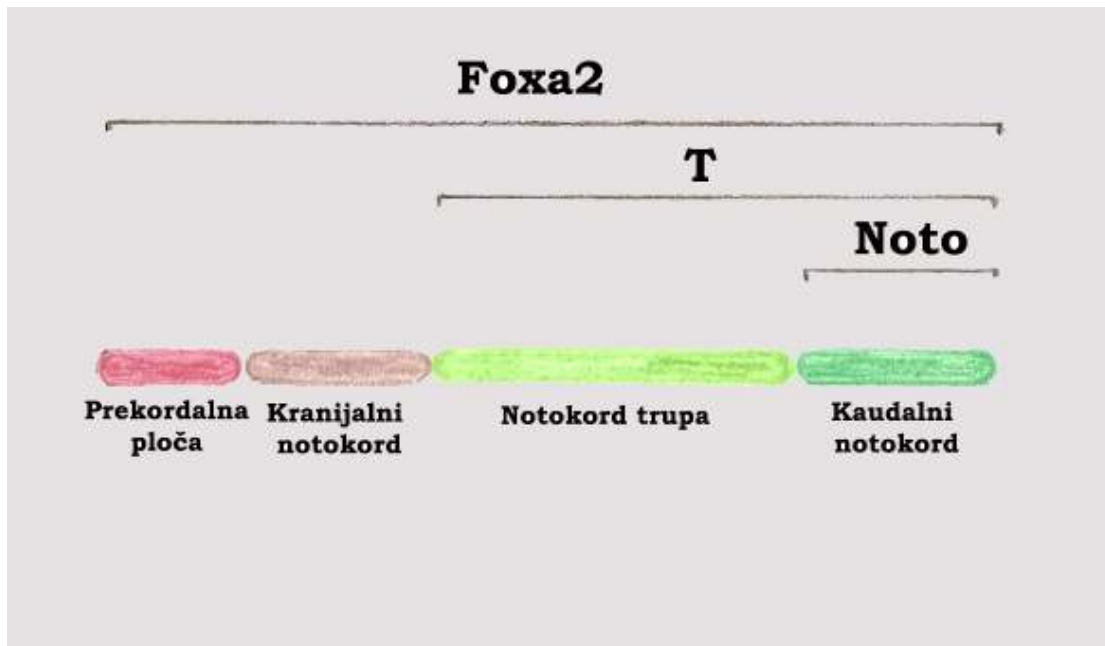
Budući da repno crijevo nema nikakvu funkcionalnu ulogu u razvoju zametka, činjenica da notokord, koji predstavlja nezamjenjiv izvor indukcijskih signala, dijeli zajedničke stanice s repnim crijevom je privukla pažnju razvojnih biologa (4,5,13,41,42). Pretpostavka da se kaudalni dio notokorda razvija na

specifičan način analizirana je u različitim studijama na različitim eksperimentalnim modelima. Možemo reći da ideja o sekundarnom razvoju notokorda predstavlja paradigmu za kompletnu teoriju sekundarnog mehanizma razvoja (43,44). Iako su neki pravci u embriologiji praktički eliminirali pojam sekundarnog mehanizma razvoja notokorda, nalazeći način kako da objasne njegov nastanak isključivo produljivanjem kranijalnog notokorda (9,12,45), nastanak notokorda produljivanjem kranijalnog dijela nije nikada zaživio kao konačno objašnjenje. Jedan od najzanimljivijih priloga ovoj raspravi jest analiza izražaja velikog broja gena prisutnih na tom stadiju razvoja zametka. Tako je pokazano da postoje barem tri vrlo različita uzorka izražaja koji posve jasno odvajaju notokord u: a) kranijalnom području zametka (engl. anterior head process), b) notokord u tijelu zametka te c) notokord u kaudalnom dijelu zametka (21) (sl.15). Zanimljivo, pažljivim čitanjem analize izražaja gena u kaudalnom dijelu zametka uočava se otežana interpretacija nalaza, budući da nije lako odrediti gdje bi točno bila granica između notokorda u tijelu i u kaudalnom dijelu zametka. Također, navodi se kako postoji određeni gradijent gena bilo u jednom ili drugom smjeru koji postepeno, a ne oštro, odvaja kaudalni dio zametka. Upravo to potvrđuje ono što je prepoznato još u prvotnim radovima Holmdahla, a nekoliko puta pokazano i na našim vlastitim istraživanjima (2,4-6). Kaudalni završetak notokorda razvija se postepenom diferencijacijom iz repnog pupoljka, pa onda takav način nastanka ukazuje na to da krajnji kaudalni dio notokorda biva proglašen posebnim odsječkom notokorda. Taj dio notokorda obilježen je nastankom iz početne mase stanica repnog pupoljka koja već na ranom stadiju sadrži subpopulaciju stanica koje su predodređene da oblikuju notokord. Iako anatomske sljubljenosti s repnim crijevom u repnom tračku, postepeno odvajanje od repnog crijeva označava nastanak samostalnog sekundarnog notokorda. Slično se načelo može vidjeti i u osobitostima sekundarne – kaudalne neuralne cijevi uspoređene s primarnom - kranijalnom strukturom (46). Na taj način dolazimo do ujedinjenja svih do sada objavljenih opažanja o nastanku sekundarnog notokorda. Radovi Le Dourain i suradnika (9,13) koji su preciznim označavanjem stanica u zametku pileta pokazali da jedan dio stanica u kaudalnom notokordu ima podrijetlo od stanica koje su nastale prolazeći kroz čvor tijekom gastrulacije se ne protive radovima koji

pokazuju da jedan dio kaudalnih stanica u notokordu ima ishodište u pred-segmentiranom repnom pupoljku (4,10). Zapravo, s velikom sigurnošću možemo reći da se radi o istim stanicama. Do sada najuvjerljiviji dokaz o postojanju populacije stanica koja je specifična za kaudalni vrh notokorda jest jasno ograničeno područje izražaja gena *Noto* koje se može pratiti od primitivne jamice do repnog pupoljka te specifičan fenotip miša koji ima onemogućen gen *Noto*.

Na ovaj indirektan način je ispunjena još jedna od zadaća ovog rada: zaključiti o mogućem mehanizmu nastanka kaudalnih struktura zametka. To pitanje je postavljeno gledajući kroz prizmu općeg principa nastanka svih struktura osnove repa. Naime, nakon što se na stadiju od 30 somita u miša zatvori kaudalni neuroporus, kaudalni dio zametka se nastavlja intenzivno produljivati oblikujući osnovu repa. Unatoč niza objavljenih studija na različitim modelima, način oblikovanja kaudalnih struktura nakon što gastrulacija završi je predmet rasprave. Tako se postavlja pitanje podrijetla, puta migracije i načina diferencijacije stanica tijekom produljivanja zametka (47-51).

Ovaj rad je potvrdio ono što je pretpostavljeno i u prethodnim studijama na drugim eksperimentalnim modelima. Kaudalni vrh zametka miša starog od 11 do 12,5 dana sadrži gustu nakupinu mezenhimskih stanica okruženih jednoslojnim pločastim epitelom. Prema kranijalno dolazi do podjele te osnove na dva dijela – dorzalnu i ventralnu. Dok dorzalna osnova oblikuje moždinski tračak, a dalje prema kranijalno neuralnu cijev, ventralna osnova čini osnovu za notokord i repno crijevo. Na ovaj način je potvrđeno da analiza serijskih rezova kaudalnog dijela zametka u navedenom razdoblju razvoja otkriva postojanje ishodišta kaudalnih struktura zametka u obliku mezenhima repnog pupoljka.



Slika 15. Sukladno morfološkim opažanjima, ali i genetskim analizama, notokord se tijekom razvoja zametka može podijeliti na slijedeće dijelove: a) prednji notokord (odgovara području prekordalne ploče i notokordu u području glave), b) notokord u području trupa i c) notokord u području kaudalnog dijela zametka. Svi odsječci notokorda u početku ovise o signalu gena *Foxa2*, dok notokord u trupu treba izražaj i gena *T*. S genetskog stajališta, kaudalni notokord je najkompleksniji, jer se u stanicama koje nastaju diferencijacijom iz repnog pupoljka nalazi ovisnost o osi *Foxa2 – T – Noto*.

5.4. Repni pupoljak je pluripotentna struktura

Jedan od načina na koji se može raspravljati o podrijetlu i ulozi repnog pupoljka jest njegov potencijal za razvoj struktura podrijetla svih triju zametnih listića. Ukoliko je sekundarni mehanizam razvoja posve neovisan o primarnom i ukoliko se zbivanja u tom području kontroliraju izražajem gena koji nisu prisutni u kranijalnom području, tada bi se moglo govoriti o neovisnom pluripotentnom ishodištu kaudalnih struktura. Analize koje su pokušale pokazati da je repni pupoljak nakupina pluripotentnih stanica su uglavnom u tome uspjele (14,15). Zaista, stanice repnog pupoljka su

sposobne dati derivate sva tri zametna listića (17). S druge strane, niti jedan od tih radova nije pratio pojedinačne stanice, već je zaključak o pluripotenciji donesen na osnovu cjelokupne mase repnog pupoljka. Stoga nisu posve iznenadile analize koje su koristile skupine novootkrivenih gena specifičnih za kaudalno područje zametka. Rezultati tih analiza su pokazali da repni pupoljak nije homogeni blastem, već da je precizno podijeljen različitim izražajima gena u tom području (9,11,12).

Ovaj rad se u potpunosti uklapa u gore navedene nalaze. Iako je repni pupoljak ishodište struktura podrijetla sva tri zametna listića, već je njegov nastanak obilježen raspodjelom stanica koje izražavaju različite skupine gena. Tako se stanice koje izražavaju gen *Noto* smještaju u sredini repnog pupoljka te su kao takve prvenstveno zadužene za nastanak kaudalnog sekundarnog notokorda.

Zanimljivo, samo vrh repnog pupoljka je pozitivan na biljeg pluripotenciji *Oct4*. *Oct4* se tradicionalno koristi kao biljeg embrionalnih matičnih stanica, odnosno stanica koje mogu dati tkiva podrijetla sva tri zametna listića (52). Činjenica da su sve stanice repnog pupoljka pozitivne na *Oct4* nije u suprotnosti niti s jednim od do sada pokazanih nalaza. Tako možemo pretpostaviti model u kojem stanice koje izražavaju *Noto* prolaze kroz rub primitivne jamice i dolaze u repni pupoljak. Tijekom preslagivanja kojim se smještaju u sredinu repnog pupoljka, izražavaju i biljeg *Oct4*, što vjerojatno ukazuje da bi njihovo premještanje na rub repnog pupoljka ili u drugu gensku domenu imalo za posljedicu da preuzmu izražaj gena tog područja i doprinesu nastanku neke druge strukture (npr. repnog crijeva, za kojeg još uvijek nemamo genski biljeg). Ova pretpostavka je podržana nalazom da neke stanice koje izražavaju *Noto* nađu svoje mjesto u *Pax1* pozitivnom području sklerotoma te sudjeluju u diferencijaciji somita.

Analiza izražaja *Sox2* nije dala tako jasne zaključke, kao što je to bio slučaj sa *Oct4*. Zanimljivo, jedino jasno vidljivo područje izražaja *Sox2* je ventralni dio sekundarne neuralne cijevi. Moguće je spekulirati kako izražaj *Sox2* u tom

području ima veze s poznatom ulogom ovog gena u ranoj diferencijaciji neuralne cijevi (53).

U zaključku, opisani rezultati jasno ukazuju kako je poremećen razvoj notokorda u mišjeg modela obilježenog nefunkcionalnom bjelančevinom *Noto* usko povezan s poremećenim razvojem repnog pupoljka. Diferencijacijski slijed kojim nastaje notokord u kaudalnom dijelu zametka je u *Noto* mutanata poremećen. To ima za posljedicu da je notokord nepravilno oblikovan ili nedostaje. Na ovaj način, koristeći genetski preinačenog miša, pokazano je da je normalan razvoj struktura u kaudalnom dijelu zametka usko povezan s normalnim diferencijacijskim slijedom u području repnog pupoljka te nepobitno ukazuje kako jedan dio kaudalnog dijela zametka i nakon završene gastrulacije nastaje diferencijacijom iz mezenhima repnog pupoljka.

6. ZAKLJUČCI

1. Izražaj gena *Noto* je prisutan u stanicama u središnjem dijelu mezenhima repnog pupoljka te se može pratiti cijelom duljinom kaudalnog notokorda.

Analiza izražaja GFP fluorescence je pokazala da se izražaj gena *Noto* može pratiti od kaudalnog notokorda do u sam vrh repnog pupoljka. Time je potvrđena hipoteza o repnom pupoljku kao ishodištu stanica notokorda te o genu *Noto* kao specifičnom biljegu kaudalnog notokorda.

2. Odvajanje sekundarnog notokorda od osnove za sekundarnu neuralnu cijev i repno crijevo je kontrolirano aktivnošću gena *Noto*.

Usporedba slijeda diferencijacije stanica repnog pupoljka između heterozigotnih i homozigotnih *Noto*^{eGFP} zametaka je pokazala da u nedostatku gena *Noto* dolazi do poremećaja u definiranju dorzalne granice repnog crijeva i ventralne granice sekundarne neuralne cijevi.

3. Poremećen razvoj kaudalnog dijela zametka u mišjoj liniji *Noto*^{eGFP} je uzrokovan poremećenim rasporedom stanica koje izražavaju *Noto* u mezenhimu repnog pupoljka.

Stanice koje izražavaju *Noto* u *Noto*^{eGFP} homozigotnih zametaka, za razliku od njihovih heterozigotnih kontrola, su obilježene nepravilnim rasporedom u mezenhimu repnog pupoljka. To ima za posljedicu nepravilnu diferencijaciju repnog tračka i nedostatak notokorda u kaudalnom dijelu zametka.

4. Nedostatak notokorda u *Noto*^{eGFP} zametaka može biti objašnjen poremećenom migracijom stanica koje izražavaju *Noto* u tkivo somita.

Mišja linija *Noto*^{eGFP} je omogućila da prepoznamo svaku stanicu koja izražava gen *Noto*. U *Noto*^{eGFP} homozigota dio stanica se ne smješta u aksijalnu ravninu u kojoj se oblikuje notokord, već se nalaze na lateralnim dijelovima mezenhima sklerotoma somita. To može objasniti nedostatak tih stanica u aksijalnoj ravnini i posljedični diskontinuitet notokorda.

5. Analiza repnog pupoljka pokazuje i morfološka i genetska obilježja pluripotentnosti.

Osim morfološke analize koja potvrđuje da se sve tri aksijalne strukture i somiti razvijaju diferencijacijom iz repnog pupoljka, analiza biljekom *Oct4* je pokazala da stanice repnog pupoljka, za razliku od njihovih kranijalnih derivata - repnog i moždinskog tračka, pokazuju obilježja pluripotentnosti. Ovaj nalaz značajno podupire sekundarni mehanizam razvoja kao zbivanje koje uključuje nediferencirane matične stanice u kaudalnom vrhu zametka.

7. SAŽETAK

Uloga gena *Noto* u razvoju kaudalnog notokorda u zametku miša

Kaudalni dio notokorda u miša razvija se između 10,5 i 12,5 dana razvoja zametka. Zametak je u tom periodu obilježen prisutnošću kompaktne nakupine stanica u kaudalnom vrhu koja se naziva repni pupoljak. Diferencijacija repnog pupoljka kao post-gastrulacijskog ostatka primitivne pruge dovodi do nastanka repnog tračka kao osnove za kaudalni notokord i repno crijevo. Gen *Noto* je evolucijski konzerviran gen prisutan samo u kaudalnom notokordu. Mišja linija *Noto*^{eGFP} omogućila je praćenjem izražaja gena *Noto* u normalnih heterozigotnih zametaka pokazati izražaj gena *Noto* u stanicama smještenim u središnjem dijelu repnog pupoljka te pratiti kontinuitet izražaja od repnog pupoljka do zrelog kaudalnog notokorda. Tim nalazom pokazano je kako je repni pupoljak građen od nekoliko subpopulacija stanica te da njihovom diferencijacijom nastaju strukture u kaudalnom dijelu zametka. U *Noto*^{eGFP} zametaka nedostaje notokord u kaudalnom dijelu zametka. Repni tračak oblikuje samo repno crijevo, dok se od ventralnog dijela moždinskog tračka odvajaju neke stanice koje ne uspijevaju oblikovati notokord. Posljedično, poremećen je izgled somita te sekundarne neuralne cijevi. Analiza izražaja gena *Noto* u kaudalnom vrhu zametka *Noto*^{eGFP} homozigota pokazala je da je poremećen raspored stanica koje izražavaju *Noto* u samom repnom pupoljku. Mnoge od tih stanica se umjesto u aksijalnoj ravnini nalaze u sklerotomu somita, što objašnjava nedostatak notokorda. Značaj ove disertacije je u tome što je pokazala kako gen *Noto* predstavlja prvi poznati specifični biljeg za notokord u kaudalnom dijelu zametka te da postojanje takvog biljega i nalaz specifičnog fenotipa odgovarajuće mišje linije potvrđuju hipotezu o razvoju kaudalnih struktura zametka diferencijacijom iz mezenhima repnog pupoljka.

8. SUMMARY

The role of *Noto* in development of the caudal part of notochord in mouse embryo

A caudal part of notochord in mouse develops between 10.5 and 12.5 days of embryo development. In that stage, a caudal tip of the embryo contains a compact group of cells referred as the tail bud. Differentiation of the tail bud, which is a remnant of the primitive streak, leads to formation of the tail cord, which gives rise to the caudal notochord and the tail gut. *Noto* is evolutionary conserved gene and it is active exclusively in the caudal notochord. Mouse line *Noto*^{eGFP} allows tracing of expression of *Noto* in heterozygous embryos. Expression of *Noto* was found in the central part of the tail bud, which was continuous with a fully formed caudal notochord. We showed that the tail bud contains several subpopulations of cells and that their differentiation leads to formation of structures present in the caudal portion of the embryo. *Noto*^{eGFP} embryos lack notochord in the caudal portion. Tail cord gives rise to the tail gut only, while a ventral portion of the medullary cord gives rise to only few scattered cells which are not able to form a normal notochord. Consequently, somites and secondary neural tube are malformed. Analyses of expression of *Noto* in the caudal portion of *Noto*^{eGFP} embryo revealed disturbed distribution of *Noto* expressing cells in the tail bud. Many of these cells, instead of central axis, populate sclerotome of somites, which leads to a segmental lack of the notochord. This dissertation showed that *Noto* represents the first known gene marker for the caudal notochord. Presence of such a marker and a specific phenotype of *Noto*^{eGFP} mouse confirm hypothesis about development of caudal structures from the tail bud mesenchyme.

9. POPIS LITERATURE

1. Sadler TW. Langman's Medical Embriology. 9th edition. Lippincot Williams & Wilkins;2004.
2. Gajović S, Kostović-Knežević Lj, Švajger A. Origin of the notochord in the rat embryo tail. *Anat Embryol* 1989;179:305-310.
3. Gajović S, Kostović-Knežević L, Švajger A. Morphological evidence for secondary formation of the tail gut in the rat embryo. *Anat Embryol* 1993;187:291-297.
4. Mitrečić D, Kostović-Knežević L, Gajović S. Morphological features of tail bud development in truncate mouse mutants. *Cells Tissues Organs* 2004;178:23-32.
5. Žižić Mitrečić M, Mitrečić D, Pochet R, Kostović-Knežević L, Gajović S. The mouse gene Noto is expressed in the tail bud and essential for its morphogenesis. *Cells Tissues Organs*. 2010;192:85-92.
6. Holmdahl DE. Experimentelle Untersuchungen uber die Lage der Grenze zwischen primarer and sekundarer Korperentwicklung beim Huhn. *Anat. Anz* 1925;59:393-396.
7. Pasteels J. Proliferations et croissance dans la gastrulation et la formation de la queue des Vertebres. *Arch Biol* 1943;54:2-51.
8. Wilson V, Beddington RSP. Cell fate and morphogenetic movement in the late mouse primitive streak. *Mech Of Dev* 1996;55:79-89.
9. Catala M, Teillet MA, Le Douarin NM. Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chicken chimaera system. *Mech Dev* 1995;51:51-65.

10. Davis RL, Kirschner MW. The fate of cells in the tailbud of *Xenopus laevis*. *Development* 2000;127:255-267.
11. Gont LK, Steinbeisser H, Blumberg B, De Robertis EM. Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 1993;119:991-1004.
12. Gofflot F, Hall M, Morris-Kay GM. Genetic patterning of the developing mouse tail at the time of posterior neuropore closure. *Dev Dyn* 1997;210:431-445.
13. Catala M, Teillet MA, De Robertis EM, Le Douarin NM. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 1996;122:2599-2610.
14. Tam PP. The histogenetic capacity of tissues in the caudal end of the embryonic axis of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1984;82:253-66.
15. Hall BK. A role for epithelial-mesenchymal interactions in tail growth/morphogenesis and chondrogenesis in embryonic mice. *Cells Tissues Organs* 2000;166:6-14.
16. Winzi MK, Hyttel P, Dale JK, Serup P. Isolation and characterization of node/notochord-like cells from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells and Development* 2011;100:1-11.
17. Griffith CM, Wiley MJ, Sanders EJ. The vertebrate tail bud: three germ layers from one tissue. *Anat Embryol* 1992;185:101-113.
18. Cleaver O, Krieg PA. Notochord patterning of the endoderm. *Dev Biol.* 2001;234:1-12.

19. Choi KS, Harfe BD. Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs. *PNAS* 2011;108:9484-9489.
20. McCann MR, Bacher CA, Séguin CA. Exploiting notochord cells for stem cell-based regeneration of the intervertebral disc. *J. Cell Commun. Signal* 2011;5:39–43.
21. Yamanaka Y, Tamplin OJ, Beckers A, Gossler A, Rossant J. Live imaging and genetic analysis of mouse notochord formation reveals regional morphogenetic mechanisms. *Dev Cell.* 2007;13:884-896.
22. Lichtneckert R, Reichert H. Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* 2005;94:465-477.
23. Talbot WS, Trevarrow B, Halpern ME, Melby AE, Farr G, Postlethwait JH, Jowett T, Kimmel CB, and Kimelman D. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 1995;378:150–157.
24. Yasuo H and Lemaire P. Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in *Xenopus* gastrulae. *Development* 2001;128:3783–3793.
25. Knezevic V, Mackem S. Activation of epiblast gene expression by the hypoblast layer in the prestreak chick embryo. *Genesis* 2001;30:264-273.
26. Abdelkhalek HB, Beckers A, Schuster-Gossler K, Pavlova MN, Burkhardt H, Lickert H, Rossant J, Reinhardt R, Schalkwyk LC, Muller I, Herrmann BG, Ceolin M, Rivera-Pomar R, Gossler, A. The mouse homeobox gene *Not* is required for caudal notochord development and affected by the truncate mutation. *Genes Dev* 2004;18:1725-1736.

27. Beckers A, Alten L, Viebahn C, Andre P, Gossler A. The mouse homeobox gene *Noto* regulates node morphogenesis, notochordal ciliogenesis, and left–right patterning. *PNAS* 2007;104:15765–15770.
28. Zhang J. The colorful journey of green fluorescent protein. *ACS Chem Biol.* 2009;4:85-88.
29. Theiler K. Anatomy and development of the truncate (boneless) mutation in the mouse. *Am J of Anat* 104;1959:319-343.
30. Pavlova MN, Clark AM, Gossler A. High-resolution mapping of the truncate (*tc*) locus on mouse chromosome 6. *Mamm Genome* 1998;10:843-845.
31. Hogan B, Beddington R, Constantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. 2.izd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
32. D'Alessandro D, Mattii L, Moscato S, Bernardini N, Segnani C, Dolfi A, Bianchi F. Immunohistochemical demonstration of the small GTPase RhoA on epoxy-resin embedded sections. *Micron.* 2004;35:287-296.
33. Groos S, Reale E, Luciano L. Re-evaluation of epoxy resin sections for light and electron microscopic immunostaining. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:397-406.
34. Beddington RS, Rashbass P, Wilson V. *Brachyury*--a gene affecting mouse gastrulation and early organogenesis. *Dev Suppl.* 1992;157-165.
35. Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 1990;343:657-659.

36. Wilson V, Manson L, Skarnes WC, Beddington RS. The T gene is necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation. *Development* 1995;121:877-886.
37. Tam PP, Tan SS. The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and the tail bud of the organogenesis-stage mouse embryo. *Development* 1992;115:703-715.
38. Kalcheim C, Ben-Yair R. Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:371-380.
39. Halpern ME, Ho RK, Walker C, Kimmel CB. Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish no tail mutation. *Cell* 1993;75:99-111.
40. McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J, Seguin CA. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech.* 2012;5:73-82.
41. Ukita K, Hirahara S, Oshima N, Imuta Y, Yoshimoto A, Jang CW, Oginuma M, Saga Y, Behringer RR, Kondoh H, Sasaki H. Wnt signaling maintains the notochord fate for progenitor cells and supports the posterior extension of the notochord. *Mechanisms of Development* 2009;126:771 –803.
42. Van Straaten HWM, Hekking JWM. Development of floor plate, neurons and axonal outgrowth pattern in the early spinal cord of the notochord-deficient embryo. *Anat Embryol* 1991;184:55-63.
43. Muller F, O'Rahilly R. The primitive streak, the caudal eminence and related structures in staged human embryos. *Cells Tissues Organs* 2004;177:2-20.

44. Handrigan GR. Concordia discors: duality in the origin of the vertebrate tail. *J Anat* 2003;202(Pt 3):255-67.
45. Catala M. Genetic control of caudal development. *Clin Genet.* 2002;61:89-96.
46. Shum A, Tang L, Copp AJ, Roelink H. Lack of motor neuron differentiation is an intrinsic property of the mouse secondary neural tube. *Developmental Dynamics* 2010;239:3192–3203.
47. Teillet MA, Lapointe F, Le Douarin NM. The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11733-11738.
48. Le Douarin NM, Halpern ME. Discussion point. Origin and specification of the neural tube floor plate: insights from the chick and zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:23-30.
49. Placzek M, Dodd J, Jessell TM. Discussion point. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:15-22.
50. Dodd J, Jessell TM, Placzek M. The when and where of floor plate induction. *Science* 1998;282:1654-1657.
51. Sausedo RA, Schoenwolf GC. Quantitative analyses of cell behaviors underlying notochord formation and extension in mouse embryos. *Anat Rec.* 1994;239:103-112.
52. Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 2002;12:321-329.
53. Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:421-424.

10. ŽIVOTOPIS

Marica Žižić Mitrečić je rođena 22.01.1976. u Splitu. Osnovnu školu je završila u Solinu, a Opću gimnaziju u Splitu. Studij medicine je upisala 1994. na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, gdje je i diplomirala 2000. Tijekom studija je bila demonstrator na Zavodu za anatomiju i Zavodu za patofiziologiju, a od treće godine studija se uključila u znanstveni projekt "Poremećaji razvoja kod genetski promijenjenih miševa", pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. Lj. Kostović-Knežević. Nakon što je završila jednogodišnji pripravnički liječnički staž na „KBC Zagreb“, 2002. je položila državni ispit. Od 2002. do 2004. je bila zaposlena kao znanstveni novak na projektu "Invertni papilom nosa i sinusa-model karcinogeneze", voditelja doc. dr. M. Bure. Od 2004. do 2009. je obavila specijalizaciju iz otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata na Kliničkom bolničkom centru Zagreb. U razdoblju od 2004. do 2007. je završila i Znanstveni poslijediplomski studij, smjer Biomedicina, na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, u sklopu kojeg je prijavila doktorsku disertaciju. Od 2009. do 2010. je kao pozvani međunarodni student obavila subspecijalizaciju iz kirurgije štitnjače i paratireoidnih žlijezda na Harvardu u Sjedinjenim Američkim Državama. Od 2011. je zaposlena kao specijalist otorinolaringolog na Zavodu za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničke bolnice "Sveti Duh" u Zagrebu. Dobitnica je druge nagrade na Državnom natjecanju iz biologije, Rektorove nagrade za najbolji studentski znanstveni rad pod vodstvom prof. dr. S. Gajovića te nagrada za najbolje prezentacije na Svjetskom susretu mladih otorinolaringologa u Rusiji i na zajedničkom međunarodnom susretu sveučilišta Salzburg i Cornell. Područja istraživanja su joj genetika i embriologija miša te primjena živčanih matičnih stanica olfaktorne regije u cilju oporavka i obnove nakon oštećenja mozga. Autorica je 6 CC indeksiranih znanstvenih radova te 15 kongresnih sažetaka. Redovni je član Hrvatskog mikroskopijskog društva, Hrvatskog društva za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, Hrvatskog društva za štitnjaču i Hrvatskog društva liječnika obiteljske medicine.