

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Katarina Kapuralin**

**Izražaj gena *Stam2* u živčanom sustavu  
miša određen na razini mRNA,  
bjelančevine, te pomoću *lacZ*  
reporterskog sustava**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Katarina Kapuralin**

**Izražaj gena *Stam2* u živčanom sustavu  
miša određen na razini mRNA,  
bjelančevine, te pomoću *lacZ*  
reporterskog sustava**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2012.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof.dr.sc. Srećko Gajović

*Ovim putem najljepše se zahvaljujem voditelju prof.dr.sc. Srećku Gajoviću na predloženoj temi, zanimljivim idejama, savjetima i pomoći tijekom izrade i pisanja ovoga rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Mariji Ćurlin na iznimnoj susretljivosti i nesebičnom trudu koji mi je bio na raspolaganju u izradi i oblikovanju ovog istraživanja.*

*Također zahvaljujem doc.dr.sc. Dinku Mitrečiću na brojnim savjetima i pomoći u provedbi in vitro pokusa. Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za neurogenetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, te Katedre za Histologiju i embriologiju.*

*Posebno hvala i mojim roditeljima i sestri, koji su tijekom cijelog mog školovanja uvijek bili uz mene, pružajući mi podršku, ali su isto tako bili usmjeravajući čimbenik koji me, kad god je to bilo potrebno, vraćao na pravi put. Hvala i Mati na podršci i pomoći pri uređivanju ove doktorske disertacije.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Aktivnost gena i međudjelovanje molekula.....	2
1.1.1. Međudjelovanje molekula .....	2
1.1.2. Post-translacijske modifikacije.....	3
1.2. STAM2 .....	5
1.2.1. Građa STAM2 .....	6
1.2.2. Uloga STAM2 u endocitozi.....	7
1.2.3. Uloga STAM2 u unutarstaničnom prijenosu podražaja .....	8
1.3. Signalizacija ESCRT .....	8
1.3.1. Kompleks ESCRT-0.....	12
1.3.2. Poremećaji u signalizaciji ESCRT .....	13
1.4. Istraživanje uloge gena .....	14
1.4.1. Miš kao pokusni model za istraživanje gena sisavaca.....	14
1.5. Transgenična mišja linija <i>Stam2</i> <sup>Gt1Gaj</sup> .....	15
1.5.1. Izražaj i moguća uloga gena <i>Stam2</i> .....	16
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	18
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	19
3.1. Opći cilj.....	19
3.2. Specifični ciljevi .....	19

4. UZORCI I POSTUPCI.....	20
4.1. Pokusne životinje.....	20
4.2. Postupci sa životinjama.....	20
4.2.1. Parenje životinja.....	20
4.2.2. Žrtvovanje životinja.....	20
4.2.3. Izolacija i određivanje starosti zametaka.....	21
4.2.4. Uzimanje uzorka vrška repa.....	21
4.3. Postupci sa stanicama.....	22
4.3.1. Primarna stanična kultura živčanih stanica kore velikog mozga.....	22
4.4. Postupci s DNA.....	22
4.4.1. Izolacija DNA.....	22
4.4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	23
4.4.3. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu.....	24
4.5. Hibridizacija RNA <i>in situ</i> upotrebom radioaktivno obilježenih izotopa.....	24
4.5.1. Izolacija i rezanje organa ili zametaka na kriostatu.....	24
4.5.2. Fiksacija tkiva.....	25
4.5.3. Označavanje sonde DNA radioaktivno obilježenim sumporom ( <sup>35</sup> S-dATP).....	25
4.5.4. Hibridizacija označene sonde s tkivom.....	26
4.5.5. Ispiranje rezova nakon hibridizacije.....	27
4.5.6. Autoradiografija.....	27
4.5.7. Uranjanje tkiva u fotografsku emulziju nakon hibridizacije RNA <i>in situ</i> .....	27
4.5.8. Vizualizacija reakcije hibridizacije RNA <i>in situ</i> na rezovima pomoću fotografske emulzije i bojanje po Nisslu.....	28

4.6.	Postupci s bjelančevinama .....	28
4.6.1.	Imunohistokemija i imunocitokemija .....	28
4.6.2.	Substancična frakcionacija .....	31
4.6.3.	Određivanje koncentracije bjelančevina metodom po Bradfordu .....	32
4.6.4.	Elektroforeza bjelančevina na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu .....	32
4.6.5.	Prijenos bjelančevina na membranu („western blot“) .....	33
4.6.6.	Inkubacija membrane specifičnim protutijelima .....	33
4.7.	Histokemijsko određivanje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze .....	35
4.7.1.	Izolacija, fiksacija i rezanje organa ili zametaka .....	35
4.7.2.	Inkubacija sa supstratom X-gal .....	36
4.8.	Kvantitativne morfološke analize .....	36
4.8.1.	Fenotipska analiza homozigotnih i heterozigotnih životinja transgenične mišje linije <i>Stam2<sup>Gt1Gaj</sup></i> .....	36
4.8.2.	Fenotipska analiza homozigotnih životinja transgenične mišje linije <i>Stam2<sup>Gt1Gaj</sup></i> i životinja divljeg tipa .....	37
4.8.3.	Statistička analiza .....	37
5.	<b>REZULTATI</b> .....	38
5.1.	STAM2 na staničnoj razini u živčanom sustavu miša .....	38
5.1.1.	Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama .....	38
5.1.2.	Bjelančevina STAM2 smještena je na endosomima živčanih stanica kao dio kompleksa ESCRT-0 .....	39
5.1.3.	Bjelančevina STAM2 smještena je u jezgri živčanih stanica .....	42
5.1.4.	Bjelančevine koje međudjeluju s bjelančevinom STAM2 nisu lokalizirane u jezgri .....	44

5.2.	STAM2 u središnjem živčanom sustavu.....	46
5.2.1.	Gen <i>Stam2</i> izražen je u središnjem živčanom sustavu .....	46
5.2.2.	Stopljena bjelančevina STAM2- $\beta$ -galaktozidaza prisutna je u središnjem živčanom sustavu.....	48
5.2.3.	Bjelančevina $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg STAM2 prisutna je u STAM2-pozitivnim stanicama središnjeg živčanog sustava .....	54
5.2.4.	Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama središnjeg živčanog sustava .....	55
5.3.	STAM2 u perifernom živčanom sustavu .....	57
5.3.1.	Bjelančevina STAM2 prisutna je u perifernom živčanom sustavu .....	57
5.3.2.	Stopljena bjelančevina STAM2- $\beta$ -galaktozidaza prisutna je u perifernom živčanom sustavu.....	57
5.3.3.	Bjelančevina $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg STAM2 prisutna je u STAM2-pozitivnim stanicama perifernog živčanog sustava .....	59
5.3.4.	Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama enteričkog živčanog sustava, te u nekim intersticijskim Cajalovim stanicama .....	60
5.3.5.	Fenotipske analize perifernog živčanog sustava nisu pokazale razlike između miševa transgenične linije <i>Stam2</i> <sup>G1Gaj</sup> i miševa divljeg tipa .....	62
5.4.	STAM2 tijekom razvoja živčanog sustava miša.....	63
5.4.1.	Gen <i>Stam2</i> izražen je tijekom razvoja živčanog sustava miša .....	63
5.4.2.	Bjelančevina STAM2 prisutna je tijekom razvoja živčanog sustava miša.....	65
5.4.3.	Stopljena bjelančevina STAM2- $\beta$ -galaktozidaza prisutna je tijekom razvoja živčanog sustava miša .....	66
5.4.4.	Bjelančevina $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg STAM2 prisutna je u STAM2-pozitivnim stanicama tijekom razvoja živčanog sustava.....	68
6.	<b>RASPRAVA</b> .....	70
6.1.	STAM2 na staničnoj razini u živčanom sustavu miša .....	70



6.1.1.	Bjelančevina STAM2 prisutna je na endosomima i u citosolu živčanih stanica	70
6.1.2.	Bjelančevina STAM2 prisutna je u jezgri živčanih stanica.....	73
6.1.3.	Bjelančevine koje međudjeluju s bjelančevinom STAM2, osim bjelančevine AMSH, nisu smještene u jezgri živčanih stanica .....	76
6.2.	STAM2 u živčanom sustavu miša .....	78
6.2.1.	Izražaj gena <i>Stam2</i> poklapa se s izražajem stopljene bjelančevine STAM2- $\beta$ -galaktozidaza u živčanom sustavu.....	78
6.2.2.	STAM2 u središnjem živčanom sustavu .....	79
6.2.3.	STAM2 u perifernom živčanom sustavu.....	84
6.3.	STAM2 tijekom razvitka živčanog sustava miša.....	86
7.	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	88
8.	<b>SAŽETAK</b> .....	90
9.	<b>SUMMARY</b> .....	91
10.	<b>POPIS LITERATURE</b> .....	92
11.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	106

## **POPIS KRATICA:**

**ALS** - engl. *amyotrophic lateral sclerosis*, amiotrofična lateralna skleroza

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

**APPL** - engl. *beta amyloid protein precursor-like*; bjelančevina slična preteči bjelančevine beta amiloid

**APS** - engl. *ammonium persulfate*; amonijpersulfat

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

**BSS** - engl. *balanced salt solution*, uravnotežena otopina soli

**CC** - engl. „*coiled coil*“, zavijena zavojnica

**cDNA** - engl. *copy DNA*

**CHMP** - engl. *chromatin modifying protein*; bjelančevina izmjene kromatina

**COPII** - engl. *coat protein complex II*, hrv. obložni bjelančevinski kompleks II

**DOA1** - engl. *degradation of  $\alpha 2 1$* , razgradnja bjelančevine  $\alpha 2 1$

**DOC** - engl. *sodium deoxycholate*, natrijev deoksiholat

**dsRNA** - engl. *double stranded RNA*, dvolančana molekula RNA

**DTT** - engl. *dithiotreitol*, ditiotreititol

**DUIM** - engl. *double-sided ubiquitin-interacting motif*, obostrana domena koja veže ubikvitin

**EDTA** - engl. *etilendiamintetraacetate*, etilendiamintetraoctena kiselina

**EEA1** - engl. *early endosome antigen 1*, antigen ranih endosoma 1

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

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

**Eps15** - engl. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*, klon br. 15 supstrata biokemijskog puta receptora epidermalnog čimbenika rasta

**ERGIC-53** - engl. *ER-Golgi intermediate compartment*, odjeljak posredovanja endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tjelešca 53

**ESCRT** - engl. *endosomal sorting complex required for transport*, endosomski razvrstavajući kompleks nužan za transport

**FYVE** - *Fab1/YOTB/Vac1/EEA1*

**GABA** - engl. *gamma-aminobutyric acid*; gama-aminomaslačna kiselina

**GAP-43** - engl. *growth associated protein 43*, bjelančevina povezana rastom 43

**GFAP** - engl. *glial fibrillary acidic protein*; kisela glijalna fibrilarna bjelančevina

**GISP** - engl. *G-protein coupled receptor-interacting scaffolding protein*; spregnuti receptor povezan s G-bjelančevinama-interaktivna građevna bjelančevina

**GM130** - engl. *cis-Golgi marker 130*, biljeg *cis* strane Golgijevog tjelešca

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

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

**HEp-2** - engl. *human epidermoid carcinoma*; humani epidermoidni karcinom

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

**HIP1** - engl. *huntingtin interacting protein*, bjelančevina povezana s bjelančevinom huntingtin 1

**HOPS** - engl. *homotypic fusion and vacuole protein sorting complex*, kompleks homotipnog spajanja i razvrstavanja bjelančevina u vakuoli

**HRP** - engl. *horseradish peroxidase*, peroksidaza iz hrena

**HRS** - engl. *hepatocyte growth factor regulated tyrosin kinase substrate*, supstrat za tirozin kinazu reguliranu hepatocitnim čimbenikom rasta

**Hse1** - engl. *class E vacuolar protein-sorting machinery protein*, molekula koja razvrstava bjelančevine u vakuoli, skupina E

**IBA1** - engl. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*; molekula prilagođivač koja veže ionizirani kalcij 1

**IL** - engl. *interleucin*, interleukin

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

**JAK** - engl. *Janus kinase*, Janus kinaza

**LDS** - engl. *lithium dodecyl sulfat*, litijdodecilsulfat

**MAP2** - engl. *microtubule-associated protein 2*, bjelančevina povezana s mikrotubulima 2

**mRNA** - engl. *messenger RNA*, glasnička RNA

**MVB** - engl. *multivesicular body*, multivezikularno tjelešce

**NeuN** - engl. *neuronal nuclei*, jezgre neurona

**NLS** - engl. *nuclear localization signal*, signal za lokalizaciju bjelančevine u jezgri

**O4** - engl. *oligodendrocyte marker O4*, oligodendrocitni biljeg O4

**PB** - engl. *phosphate buffer*, fosfatni pufer

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

**PBST** - engl. *phosphate buffered saline Tween 20*, puferirana otopina fosfatnih soli Tween 20

**PCR** - engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

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

**PGP9.5** - engl. *protein gene product 9.5*, bjelančevina produkt gena 9.5

**PIPES** - engl. *piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)*, piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina)

**PSAP** - *prolin/serin/alanin/prolin*

**PtdIns(3)P** - engl. *phosphatidylinositol 3-phosphate*, fosfatidilinozitol(3)-fosfat

**PVDF** - engl. *polyvinylidene fluoride*, polivinilidenfluorid

**Rab5** - engl. *Rab protein 5*, bjelančevina Rab 5

**RIN1** - engl. *Ras and Rab interactor 1*, bjelančevina koja međudjeluje s bjelančevinama Ras i Rab

**RNAi** – engl. *RNA interference*, interferencija RNA

**RNAi** - engl. *RNA interference*, RNA utišavanje

**RSP5** - engl. *radial spoke protein 5*, bjelančevina radijalnih prečaka 5

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

**SDS** - engl. *sodiumdodecylphosphate*, natrijdodecilsulfat

**SEC31A** - engl. *SEC31-related protein A*, bjelančevina povezana s bjelančevinom SEC31A

**SH3** - engl. *Src homology 3*; domena homologna molekuli Src

**SNAP-25** - engl. *synaptosomal-associated protein 25*, bjelančevina povezana sa sinaptosomima 25

**SSC** - engl. *saline sodium citrate*, slani natrijev citrat

**SSM** - engl. *STAM-specific motif*, dio bjelančevine specifičan za STAM

**STAM** - engl. *signal transducing adaptor molecule*, molekula prilagodivač prijenosa podražaja

**STAT5** - engl. *signal transducers and activators of transcription 5*, prijenosnici podražaja i aktivatori transkripcije 5

**TDP-43** - engl. *TAR DNA-binding protein 43*, bjelančevina koja se veže za TAR DNA 43

**TE** - Tris-EDTA

**TEA** - engl. *triethanolamine*, trietanolamin

**TEMED** - engl. *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin

**Tris** - engl. *trishydroxymethylaminmetane*, trishidroksimetilaminometan

**t-RNA** - engl. *transfer RNA*, prijenosna RNA

**TSG101** - engl. *tumor susceptibility gene 101*, gen osjetljiv na tumor 101

**UBP7** - engl. *ubiquitin-specific processing protease 7*, ubikvitin specifična proteaza 7

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

**UEV** - engl. *ubiquitin E2 variant*, varijanta ubikvitina E2

**UIM** - engl. *ubiquitin-interacting motif*, domena koja veže ubikvitin

**VAMP** - engl. *vesicle-associated membrane protein 1*, membranska bjelančevina povezana s mjehurićima

**VEGF** - engl. *vascular endothelial growth factor*, vaskularni endotelni čimbenik rasta

**VHS** - *Vps-27/Hrs/Stam*

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

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

## 1. UVOD

Crick i Watson na temelju rezultata svojih kolega 1953. godine opisali su model dvostruke uzvojnice DNA, kao nosioca genetičke informacije (1) i od tog je vremena značajan napredak postignut u razumijevanju nasljedne osnove koja nas određuje. Nekoliko desetljeća kasnije pokrenut je „Projekt humanog genoma“, s ciljem sekvencioniranja cijelog ljudskog genoma, a prva nepotpuna verzija objavljena je začuđujućom brzinom 2001. godine (2, 3). Zbog razvoja računalnih tehnologija za pohranjivanje i obradu podataka, cjelovita je verzija dovršena dvije godine kasnije, ranije no što se planiralo. Već je tada ovo revolucionarno otkriće razotkrilo neke tajne, a najveća je bila u tome da humani genom sadrži mnogo manje gena no što se očekivalo. Od prvotno procijenjenih 100 000 gena, znanstvenici su otkrili tek njih 25 000, i postalo je jasno kako veličina genoma nije razmjerna složenosti organizma (4). Premda je informacija, odnosno zapis 3,2 milijarde parova baza bio poznat, problem u interpretaciji prikupljenih podataka predstavljao je veliki pritisak. Shvatilo se kako sekvencioniranjem genoma nije bilo moguće predvidjeti hoće li osoba oboljeti od neke bolesti, niti je to odmah riješilo probleme nasljednih bolesti.

Da bi se postigla medicinska primjena potrebno je mnogo više informacija od poznavanja same sekvence gena. Iako je u genima zapisan program razvitka i djelovanja živog organizma, ipak su bjelančevine molekule koje ostvaruju genetički zapis. Stoga su se nakon genomike razvijale nove grane molekularne biologije, posebice proteomika, kao disciplina koja se bavi bjelančevinskom komponentom genoma, a koja je nastala sa svrhom da nadopuni istraživanja genomike (5, 6, 7). Ono što je još uvijek nepoznato, a na što su svakako usmjereni budući izazovi, jest povezivanje sekvenci svih gena s ulogom njihovog bjelančevinskog kompleksa. Rekonstruiranje mreže međudjelovanja gena i bjelančevina polako će nalaziti svoju primjenu u liječenju bolesti i razvoju novih terapijskih koncepata, a poznavanje temeljnih molekularnih osnova fiziološki zdravog sustava pomoći će odrediti narav oštećenja u bolesnom sustavu (8, 9).

## 1.1. Aktivnost gena i međudjelovanje molekula

Prijenos informacije u stanici koja uključuje genetički materijal nazvan je centralna dogma: segment DNA odgovoran za svaki gen prepisuje se u molekulu mRNA (engl. *messenger RNA*; glasnička RNA), čiji redosljed baza služi za usmjeravanje sinteze specifične bjelančevine sastavljene od građevnih blokova aminokiselina (10). Transkripcija je proces u kojem se sintetizira molekula RNA iz kalupa DNA upotrebljavajući pravilo komplementarnosti nukleotida. Proces u kojem RNA kontrolira sintezu bjelančevina naziva se translacija (11). Određene kontrolne sekvence određuju početak i kraj segmenata DNA koji trebaju biti prepisani u RNA. Druge blisko povezane sekvence DNA određuju hoće li odgovarajući segment DNA uistinu biti prepisan u određenoj stanici, i ako hoće, pod kojim uvjetima (12). U eukariota, transkripcija i translacija prostorno su odijeljeni procesi. Primarni se transkripti u jezgrama viših organizama temeljito modificiraju, cijepaju i nadovezuju. Samo mali dio molekula RNA sintetiziranih u jezgri pojavit će se u citosolu kao mRNA. Izražaj bjelančevina regulira se na nekoliko razina, uključujući: transkripcijske, post-transkripcijske i pred-translacijske procese koji utječu na kvantitativnu razinu izražaja mRNA, zatim translacijske procese koji reguliraju pretvorbu mRNA u bjelančevine, te post-translacijske, odnosno degradacijske procese koji utječu na stabilnost poluživota bjelančevina (13).

### 1.1.1. Međudjelovanje molekula

Sva živa bića sintetiziraju bjelančevine, a može se reći kako svaku stanicu određuje vrsta bjelančevine koju stanica sintetizira. Glavni cilj svih morfoloških i biokemijskih istraživanja jest razumjeti kako međudjelovanje makromolekula regulira biološke aktivnosti unutar prirodne okoline, odnosno žive stanice. Izazov je težak zbog složenosti žive tvari, te nedostatka odgovarajućih *in vivo* metoda (14).

Mnoge se bjelančevine sastoje od više podjedinica, odnosno funkcionalnih domena, od kojih je svaka neovisan polipeptidni lanac. Međudjelovanja polipeptidnih lanaca važna su u regulaciji aktivnosti bjelančevina. Mnogi eukariotski transkripcijski faktori djeluju kao aktivatori ili represori upravo zbog međudjelovanja s komponentama središnjeg transkripcijskog kompleksa. Mnoga takva međudjelovanja igraju ključnu ulogu u kontroli različitih vidova staničnog ponašanja. Tako je primjerice, signal iz vanjske sredine

posredovan u unutrašnjost stanice međudjelovanjima bjelančevina signalnih molekula procesom koji se naziva prijenos podražaja (15). Međudjelovanja bjelančevina vremenski su ograničena. Ona mogu trajati dulje vrijeme, tako da se stvaraju bjelančevinski kompleksi ili pak bjelančevine mogu međusobno reagirati vrlo kratko u svrhu modifikacija (npr. fosforilacija), a ovakve modifikacije bjelančevina mogu i same promijeniti međudjelovanje bjelančevine s novim bjelančevinama. Međudjelovanje bjelančevina vrlo je kompleksno i od središnje je važnosti gotovo svakog procesa u živoj stanici. Informacije o tim međudjelovanjima unaprjeđuju naša znanja o bolestima i mogu pružiti osnovu novih terapijskih pristupa (16).

### **1.1.2. Post-translacijske modifikacije**

Na međudjelovanja bjelančevina koje sudjeluju u procesima prijenosa podražaja dodatno utječu post-translacijske modifikacije bjelančevinske strukture. Post-translacijske kovalentne modifikacije su jedan od mehanizama koji regulira stanične procese. Takve modifikacije mogu izmijeniti jačinu ili broj interakcija u kojima ove bjelančevine sudjeluju ili ih pak preusmjeriti na substanične odjeljke koji su potrebni za pravilno funkcioniranje. Post-translacijske modifikacije omogućuju bjelančevinama stjecanje novih svojstava. Neke od najčešćih pos-translacijskih modifikacija su: fosforilacija, metilacija, acetilacija i ubikvitinacija (14).

Fosforilacija bjelančevina je post-translacijska modifikacija u kojoj su serinski, treoninski ili tirozinski ostaci fosforilirani kinazama, dodavanjem fosfatne grupe na bjelančevinu kovalentnim vezama. Jednoj aminokiselini mogu biti dodane samo pojedinačne fosfatne jedinice, međutim isti polipeptidni lanac može biti fosforiliran na nekoliko različitih mjesta. Na taj se način proizvodi mnoštvo fosfoizofoma, od kojih svaka može imati potencijalno različitu biološku aktivnost (17). Nadalje, isti polipeptidni lanac može biti modificiran različitim vrstama post-translacijskih modifikacija što dovodi do još većeg broja izoforma iste bjelančevine. Tako primjerice, endocitoza receptora tirozinskih kinaza zahtjeva tirozinsku fosforilaciju i monoubikvitinaciju receptora i nizvodnih komponenata na lizinskim ostacima kako bi se usmjerio endocitotski teret za nadolazeću degradaciju ili pak za recikliranje na površinu stanice (18, 19).



Bjelančevina tirozin kinaza može aktivirati unutarstanični signalni put vezanjem bjelančevina s domenama SH2 za peptid koji sadrži fosforilirani tirozin. Aktivirani receptor tirozinske kinaze, kao što je primjerice receptor epidermalnog čimbenika rasta, fosforilira se na više tirozinskih mjesta, a svako od ovih mjesta selektivno se veže na domenu SH2 jedne ili više citoplazmatskih signalnih bjelančevina, što potom aktivira specifični unutarstanični signalni put (20). Regulacija bjelančevina fosforilacijom jedan je od najčešćih načina regulacije uloge bjelančevina. Mijenjanjem svoje fosforilirane u nefosforiliranu formu, bjelančevine mijenjaju svoj inaktivan u aktivan oblik, ili pak obrnuto.

Polipeptidi koji sadrže lizinske (ili argininske) ostatke mogu biti metilirani ili acetilirani što dovodi do njihovog prepoznavanja kromodomenama ili bromodomenama. Ove domene nalaze se u bjelančevinama koje reguliraju kromatinsku strukturu, a najbolje su istražene u histonima. Dodavanje metilnih grupa katalizira se enzimom metiltransferazom, a dodavanje acetilne funkcionalne grupe katalizira se enzimom acetiltransferazom. Ovakve lizinske modifikacije istaknuta su značajka fleksibilnih N- i C- terminalnih krajeva histona, te su važni za grupiranje histona i promjene u kromatinskoj organizaciji i epigenetičkoj kontroli genskog izražaja. Histoni su također dobar primjer bjelančevina koje mogu sadržavati nekoliko različitih post-translacijskih modifikacija, koje uključuju: acetilaciju, metilaciju, fosforilaciju i ubikvitinaciju. Ovakva značajka dozvoljava stvaranje mnogo mogućih kombinacija post-translacijskih modifikacija, koje se potom mogu povezivati različitim bjelančevinskim domenama. Ova međudjelovanja nisu uvijek kooperativna, ona mogu biti međusobno isključiva, međusobno uvjetovana ili antagonistička (21, 22) .

Ubikvitinacija je proces post-translacijske modifikacije pri kojoj se lizinski ostaci bjelančevine kovalentnom vezom povežu s jednim ili više ubikvitinskih monomera. Ubikvitin je mala regulatorna bjelančevina vrlo konzervirane sekvence, tako da primjerice, ljudi i kvasci dijele 96% sekvence. Sastoji se od svega 76 aminokiselina i ima molekulsku masu od 8.5kDa. Kada se ubikvitin oslobodi svojih polipeptidnih prekursora specifičnim proteazama, dolazi do enzimskih kaskada reakcija koji uključuju enzime za: aktivaciju ubikvitina (E1), prijenos ubikvitina (E2), te ligaciju ubikvitina (E3). To u konačnici dovodi do kovalentnog vezivanja ubikvitina na lizinske ostatke N-terminalnog dijela bjelančevine (23). Pojedinačne molekule ubikvitina mogu se vezati na samo jedno mjesto u ciljanoj bjelančevini (monoubikvitinacija) ili pak na nekoliko lizinskih ostataka iste bjelančevine (višestruka ubikvitinacija ili

multiubikvitinacija). Međutim, sam ubikvitin posjeduje 7 lizinskih ostataka koji mogu biti modificirani tako da dalje vežu ubikvitin i formiraju poliubikvitinske lance koji se tada vežu na ciljnu bjelančevinu (poliubikvitinacija) (24,25). Monoubikvitinacija se smatra jednim od glavnih signalnih događaja koji posreduje u složenim staničnim procesima, od kojih su najbolje proučeni endocitoza i popravak DNA (26), dok je poliubikvitinacija signal za proteosomsku degradaciju (27). Smatra se da sposobnost različitog signaliziranja ubikvitina u obliku monoubikvitina ili poliubikvitinskog lanca ovisi o specifičnim funkcionalnim domenama bjelančevina koje su ligandi ubikvitina. Do danas je poznato petnaestak takvih ubikvitin-vezujućih domena (28).

## 1.2. STAM2

Molekula STAM2 otkrivena je 2000. godine od strane triju nezavisnih istraživačkih skupina.

Takata i suradnici upotrebom kvašćeva sustava dvaju hibrida tražili su bjelančevine koje ostvaruju specifična međudjelovanja s već poznatom bjelančevinom HRS (engl. *hepatocyte growth factor regulated tyrosin kinase substrate*; supstrat za tirozin kinazu reguliranu hepatocitnim čimbenikom rasta), za koju se pretpostavljalo da ima regulatornu ulogu u endocitozi receptora čimbenika rasta. Pritom je korištena banka komplementarnih DNA (cDNA, engl. *copy DNA*) mišje jetre, budući da je mRNA HRS vrlo izražena u tom organu. Pronađena bjelančevina koja ostvaruje interakcije s bjelančevinom HRS nazvana je HBP (engl. *HRS binding protein*; bjelančevina koja veže molekulu HRS) (29).

Endo i suradnici pretražujući banku cDNA fetalnog ljudskog mozga našli su gen čija je sekvenca bila homologna već poznatom genu *Stam*, za koji se pretpostavljalo da je uključen u signalizaciju sinteze DNA i indukcije gena *c-myc* nakon stimulacije citokinima. Budući da je pronađena bjelančevina posjedovala iste funkcionalne domene kao već poznata bjelančevina STAM (engl. *signal transducing adaptor molecule*; molekula prilagođivač prijenosa podražaja) nazvana je STAM2, a pretpostavljalo se kako je humani homolog netom pronađene mišje bjelančevine HBP (30).

Pandey i suradnici pronašli su bjelančevinu STAM2 tražeći nove, tirozin fosforilirane supstrate receptora epidermalnog čimbenika rasta u kulturi HeLa stanica metodom masene

spektrometrije. Budući da se pokazalo kako je pronađena bjelančevina bila 55% identična molekuli STAM, nazvana je STAM2 (31).

Nešto kasnije, 2002 godine Ćurlin i suradnici otkrili su gen *Stam2* tražeći gene odgovorne za razvoj živčanog sustava miša postupkom genske zamke (32). Gen je isprva nazvan *Lobel*, a nakon objavljivanja slijeda nukleotida gena *Stam2* njegov je naziv promijenjen.

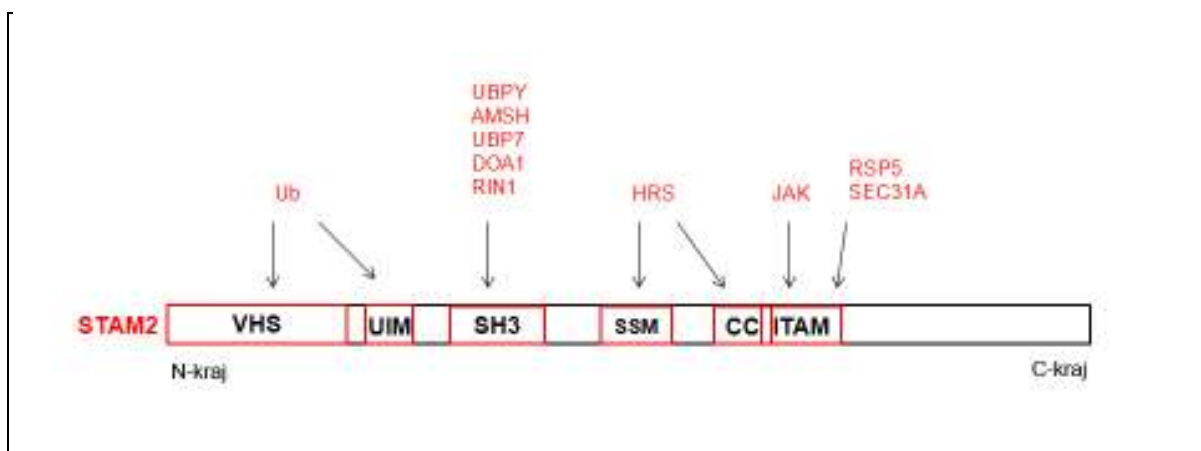
### 1.2.1. Građa STAM2

Gen *Stam2* sastoji se od 1569 pb, a kodira bjelančevinu dugu 525 aminokiselina. Izračunata molekulska masa bjelančevine STAM2 iznosi 58 kDa (29).

U sisavaca su prisutne dvije molekule iste porodice bjelančevina, STAM1 i STAM2. Molekule STAM evolucijski su konzervirane, s dijelovima domena očuvanim u *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*, a prisutne su unutar citoplazme, s citoplazmatske strane ranih endosoma, gdje se vežu za bjelančevinu HRS. (33,34,35).

Iako molekula STAM2 sa STAM1, pripadnikom iste porodice bjelančevina dijeli tek oko 50% sličnosti u pogledu redoslijeda aminokiselina, u pogledu funkcionalnih domena ta je sličnost čak i do 89%, stoga se smatra da obje bjelančevine imaju slične uloge (30). Obje bjelančevine STAM na svom N-terminalnom kraju posjeduju domenu VHS (Vps-27/Hrs/Stam), koja zajedno sa susjednom domenom UIM (engl. *ubiquitin-interacting motif*; domena koja veže ubikvitin) sudjeluje u vezanju ubikvitina i ubikvitiranih bjelančevina (33). Zatim slijedi domena SH3 (engl. *Src homology 3*; domena homologna molekuli Src) za koju se vežu enzimi koji vrše deubikvitinaciju: AMSH (engl. *associated molecule with the SH3 domain of STAM*; molekula povezana s domenom SH3 molekule STAM), UBPY (engl. *ubiquitin isopeptidase Y*; ubikvitin izopeptidaza Y), i UBP7 (engl. *ubiquitin-specific processing protease 7*; ubikvitin specifična proteaza 7) (36,37,38), enzim koji vrši ubikvitinaciju DOA1 (engl. *degradation of  $\alpha 2 1$* ; razgradnja bjelančevine  $\alpha 2 1$ ) (39), te bjelančevina uključena u endocitozu neubikvitiniranih receptora RIN1 (engl. *Ras and Rab interactor 1*; bjelančevina koja međudjeluje s bjelančevinama Ras i Rab) (40). Domene CC (engl. *“coiled coil”*, zavijena uzvojnica) i SSM (engl. *STAM-specific motif*, dio bjelančevine specifičan za STAM) odgovorne su za vezanje bjelančevina STAM za bjelančevinu HRS (29,34). Na C-

terminalnom kraju nalazi se domena ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; dio bjelančevine odgovoran za aktivaciju imunoreceptorima na osnovi fosforilacije tirozina), domena koja je odgovorna za vezanje JAK (Janus kinaza), koja je dio porodice tirozinskih kinaza. Unatoč važnosti ove domene u signaliziranju tirozinske fosforilacije i bjelančevinskim međudjelovanjima, ova je domena ipak odsutna kod bjelančevina STAM beskraljčnjaka (30,31,41). Za C-terminalni kraj bjelančevine STAM2 vežu se još molekule RSP5 (engl. *radial spoke protein 5*; bjelančevina radijalnih prečaka 5) (42), te SEC31A (engl. *SEC31-related protein A*; bjelančevina povezana s bjelančevinom SEC31A) (43) (slika 1).



**Slika 1.** Shematski prikaz građe bjelančevine STAM2 s domenama VHS, UIM, SH3, SSM, CC i ITAM, te bjelančevina koje se vezuju za pojedine domene STAM2.

### 1.2.2. Uloga STAM2 u endocitozi

Najbolje proučena uloga bjelančevine STAM2 je da kao dio kompleksa ESCRT sudjeluje u razvrstavanju ubikvitiranih bjelančevina unutar endosoma, koje se dalje prosljeđuju u lizosome. Sve domene koje posjeduje STAM2, osim C-terminalne domene ITAM, važne su za proces endocitoze. Postojanje više od jedne ubikvitin-vezujuće domene (VHS i UIM) omogućuje vezivanje ubikvitiniranih bjelančevina za STAM2, koji tada regulira usmjeravanje bjelančevina prema ostalim komponentama kompleksa ESCRT, te naposljetku prema razvrstavanju u lizosomima. Domenama SSM i CC, STAM2 se veže za molekulu HRS, čime osigurava svoj smještaj na membrani ranih endosoma. Također, sve je veći broj bjelančevina

za koje se smatra da u nekom dijelu staničnog ciklusa međudjeluju s bjelančevinom STAM2, a mnoge takve bjelančevine također aktivno sudjeluju u pojedinim fazama endocitoze (44).

### **1.2.3. Uloga STAM2 u unutarstaničnom prijenosu podražaja**

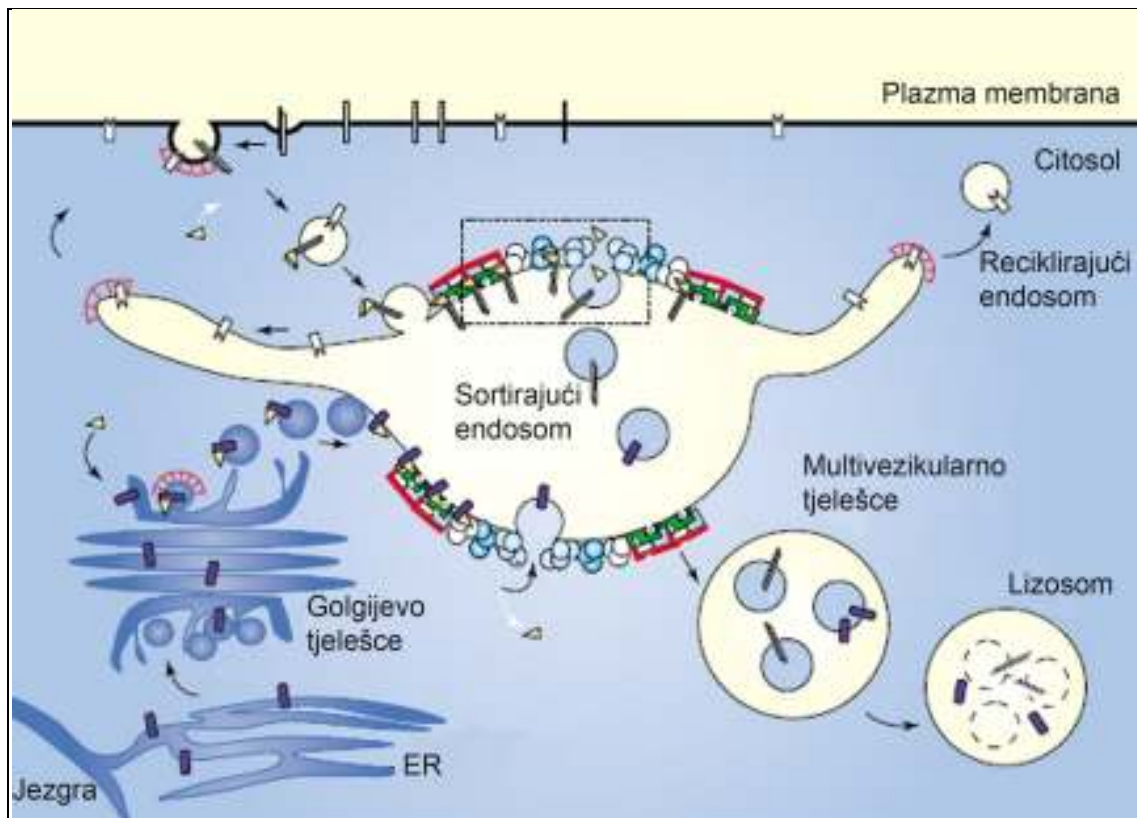
STAM2 je otkriven prvi puta kao bjelančevina visoko fosforilirana na tirozinskim ostacima, uključena u odgovor na citokine (IL-2, IL-3 (interleukin -2, -3) i GM-CSF (engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*; čimbenik poticanja kolonija granulocita/makrofaga)) i stimulaciju čimbenika rasta (EGF (engl. *epidermal growth factor*; epidermalni čimbenik rasta), PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*; trombocitni čimbenik rasta) i HGF (engl. *hepatocyte growth factor*; hepatocitni čimbenik rasta)) (29,30,31). Budući da se pomoću svoje domene ITAM STAM2 povezuje s tirozinskim kinazama JAK2 i JAK3, dokazano je da sudjeluje u citokinima (IL-2, IL-3 i GM-CSF) posredovanoj indukciji gena *c-myc* odgovornog za pokretanje staničnog ciklusa i sintezu DNA (30).

Domena SH3 također upućuje na djelovanje STAM2 u prijenosu podražaja, i to kao molekule prilagođivača, što se navodi i u samom nazivu molekule (molekula prilagođivač prijenosa podražaja). Molekule prilagođivači same ne prenose podražaje, već pomoću specifičnih domena povezuju dvije signalne molekule i omogućuju prienos podražaja (36,37, 45).

### **1.3. Signalizacija ESCRT**

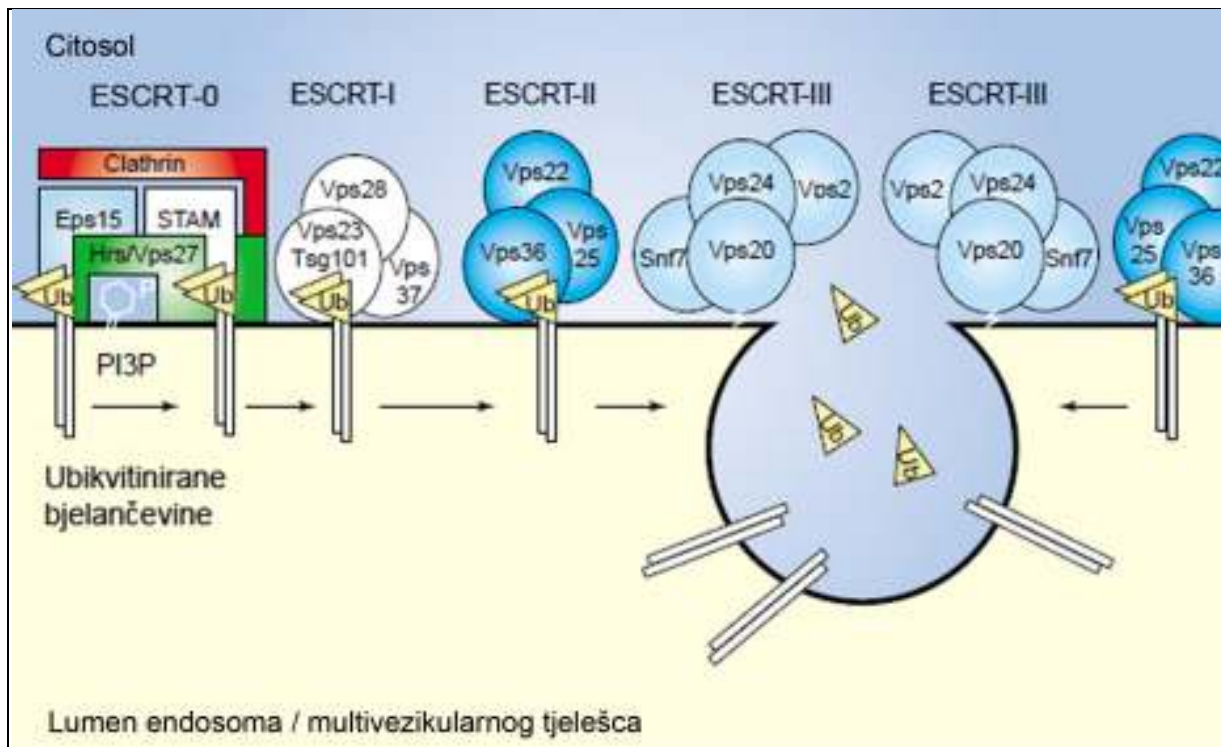
Sve stanice primaju signale iz svoje okoline i odgovaraju na njih. Ponašanje stanica višestaničnih organizama pažljivo se nadzire kako bi se osigurale potrebe organizma u cjelini. Usklađivanje među stanicama postiže se pomoću različitih signalnih molekula koje se izlučuju ili izlažu na površini jedne stanice i vežu za receptore izložene na površini drugih stanica. Njihovim vezanjem za specifične receptore, započinje niz unutarstaničnih promjena koji nadziru gotovo sve vidove staničnog ponašanja, kao što su: metabolizam, kretanje, proliferacija, preživljavanje i diferencijacija. Razumijevanje molekularnog mehanizma koji je odgovoran za putove staničnog signaliziranja, te njegov utjecaj na poremećaje i nastanak bolesti, postalo je važno područje istraživanja u suvremenoj biomedicini (46).

Promet kroz staničnu membranu dinamičan je proces kojim unutrašnjost stanice komunicira sa staničnom okolinom. Molekule na staničnoj površini, uključujući receptore za signalne molekule, uvlače se sa stanične površine u membranske odjeljke koji se nazivaju rani endosomi, postupkom endocitoze (47). Postupno sniženje pH, odnosno porast kiselosti endosoma uzrokuje razdvajanje kompleksa receptor-ligand. Kako dozrijevaju, rani endosomi postaju kasni endosomi, a nakon stvaranja intraluminalnih mjehurića nazivaju se multivezikularna tjelešca (MVB, engl. *multivesicular body*). Multivezikularna tjelešca konačno se spajaju s lizosomima, kiselim odjeljcima punim enzima za razgradnju u kojima se događa proteoliza, odnosno hidroliza bjelančevina. Na taj način putuju, primjerice, receptori epidermalnog čimbenika rasta (EGFR; engl. *epidermal growth factor receptor*). Međutim, postoje receptori koji na jednak način dospiju u rane endosome, ali se ne razvrstavaju prema lizosomima i degradaciji, već se putem reciklirajućih endosoma vraćaju na staničnu površinu (48). Smatra se da vezanje molekula ubikvitina na receptore ima ključnu ulogu u njihovu usmjeravanju prema razgradnji u lizosomima (49, 50) (slika 2). Ubikvitin je mala bjelančevina od svega 76 aminokiselina, koja je značajno konzervirana kod sisavaca, a konjugira se s lizinskim ostacima bjelančevinskog supstrata. U stanici služi obilježavanju bjelančevina koje stanici više nisu potrebne. Bjelančevine namijenjene razgradnji u lizosomima vežu na sebe pojedinačne molekule ubikvitina na više veznih mjesta procesom višestruke monoubikvitinacije. Za razliku od bjelančevina namijenjenih lizosomskoj razgradnji, one namijenjene razgradnji u proteosomima, enzimima koji razgrađuju bjelančevine, obično kratkog poluživota, vežu na sebe poliubikvitinski lanac (24, 25).



**Slika 2.** Shematski prikaz usmjeravanja ubikvitiniranih bjelančevina sa stanične membrane kroz endosome i multivezikularna tjelešca prema lizosomima (preuzeto i prilagođeno iz 47).

Receptori se razvrstavaju za razgradnju u lizosomima ili za recikliranje uz pomoć kompleksa ESCRT (engl. *endosomal sorting complex required for transport*; endosomski razvrstavajući kompleks nužan za transport) (48, 51, 52). Kompleks ESCRT usmjeruje receptore u lumen multivezikularnih tjelešaca koji se potom spajaju s lizosomima. Čitav je kompleks ESCRT podijeljen na četiri podjedinice, od kojih su tri podjedinice ubikvitin-vezane: ESCRT-0, I, II, a preostala podjedinica djeluje obrnuto, tj. sudjeluje u procesu deubikvitinacije, a naziva se ESCRT III. Ubikvitinirane molekule, kao što su primjerice receptori epidermalnog čimbenika rasta, najprije prepoznaje podjedinica ESCRT-0, a potom se one postupno predaju drugim podjedinicama ESCRT-a (ESCRT-I, II i III). Tijekom tih koraka molekule se invaginiraju u multivezikularna tjelešca i razvrstavaju prema lizosomima (53) (slika 3).



**Slika 3.** Shematski prikaz podjedinica kompleksa ESCRT (ESCRT 0,-I, II i III) koje usmjeruju ubikvitinirane bjelančevine u lumen multivezikularnih tjelešaca. Za razliku od prethodne tri podjedinice, koje su ubikvitin-vezane, ESCRT-III sudjeluje u procesu deubikvitinacije (preuzeto i prilagođeno iz 47).

Mehanizam ESCRT koji je odgovoran za način na koji stanica usmjerava endocitozom uvučene receptore, otkriven je u kvascima (*Saccharomyces cerevisiae*), gdje molekule koje sudjeluju u ESCRT-u pripadaju klasi E *Vps* (engl. *vacuolar protein sorting*; molekula koja razvrstava bjelančevine u vakuoli) koja se sastoji od 13 gena (48). Genetičke i biokemijske studije pokazale su na mutantima klase E *Vps* kako se ovaj mehanizam sastoji od dva ubikvitin-vezana kompleksa (ESCRT –I i –II), te jednog kompleksa koji privlači deubikvitinirane enzime (ESCRT III), kako se sam ubikvitin ne bi razgradio u lizosomu. Naknadno je u paralelnim studijama na kvascima, vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*) i na stanicama sisavaca pokazano kako postoji i četvrti kompleks bjelančevina koji djeluje uzvodno od ESCRT I, stoga je nazvan ESCRT-0 (53).



### 1.3.1. Kompleks ESCRT-0

Kompleks ESCRT-0 sastoji se od dvije podjedinice: u kvascima su to bjelančevine Vps 27 i Hse1 (engl. *class E vacuolar protein-sorting machinery protein*; molekula koja razvrstava bjelančevine u vakuoli, skupina E). Ove molekule odgovaraju molekulama HRS i STAM u sisavaca (35, 54). Bjelančevine ESCRT-0 evolucijski su konzervirane od kvasca do čovjeka, ali za razliku od ostalih podjedinica kompleksa ESCRT, nisu pronađene u biljaka (55).

Objee ove podjedinice posjeduju domenu koja vezuje ubikvitin i ubikvitinirane bjelančevine. Također posjeduju domenu VHS, još uvijek nedovoljno poznate uloge, a koja također sudjeluje u vezanju ubikvitina (33, 35). Ono što je specifično samo za podjedinicu HRS jest sposobnost vezanja endosomskog lipidnog fosfatidilinozitol(3)-fosfata (PtdIns(3)P) na ograničenim područjima membrane ranih endosoma za koju je pričvršćen ravni klatrinski omotač, različit od onoga na klatrinskim mjehurićima (56). Upravo vezanje za PtdIns(3)P pomoću svoje *zink-finger* domene FYVE (*Fab1/YOTB/Vac1/EEA1*) osigurava molekuli HRS, a time i molekulama kompleksa ESCRT-0, položaj na citoplazmatskoj strani membrane ranih endosoma (57), budući da se bjelančevine STAM pomoću svojih domena CC i SSM vežu za molekulu HRS (29, 34).

HRS i STAM su modularne, multidomenske bjelančevine, koje se pomoću svojih domena vezuju za mnoštvo drugih molekula (44). Jedna od takvih molekula je i Eps15, bjelančevina koja vezuje ubikvitin, a pokazano je kako je povezana s bjelančevinama kompleksa ESCRT-0 u humanim stanicama. Iako njezina uloga nije u potpunosti poznata, ova bjelančevina pomaže bjelančevinama ESCRT-0 u razvrstavanju receptora epidermalnog čimbenika rasta i njegovoj degradaciji (58).

ESCRT-0 veže ubikvitinirane bjelančevine kroz objee svoje podjedinice. HRS prepoznaje ubikvitinirane bjelančevine pomoću svoje domene DUIM (engl. *double-sided ubiquitin-interacting motif*; obostrana domena koja veže ubikvitin) (59), dok bjelančevine STAM posjeduju domene UIM i VHS (33, 35). Bjelančevine STAM dodatno posjeduju domenu SH3 koja privlači deubikvitinirajuće enzime AMSH i UBPY (36, 37).

HRS se veže na domenu UEV (engl. *ubiquitin E2 variant*; varijanta ubikvitina E2) uzvodnog kompleksa ESCRT-I pomoću aminokiselinske domene PSAP (prolin/serin/alanin/prolin) (60,

61). Pomoću navedene mreže međudjelovanja kompleks ESCRT-0 veže uzvodni mehanizam endocitoze s nizvodnim mehanizmom razgradnje receptora putem multivezikularnih tjelešaca, odnosno lizosoma.

### 1.3.2. Poremećaji u signalizaciji ESCRT

Ubikvitiniranje bjelančevina nužno je za pravilnu funkciju živčanog sustava, budući da je to proces ključnog obilježavanja tijekom prometa bjelančevina, također tijekom retrogradnog aksonskog transporta signala koji održava živčane stanice kako bi izbjegle propadanje.

Budući da nizvodna regulacija receptora posredovana ligandima igra važnu ulogu u gašenju signala, ne začuđuju nedavno otkrivene činjenice da je narušena uloga tih bjelančevina povezana s nastajanjem bolesti, posebice neurodegenerativnih bolesti (62,63,64). Najdirektnija spoznaja da ispravno djelovanje kompleksa ESCRT štiti od neurodegenerativnih bolesti, proizlazi iz proučavanja autosomalnih dominantnih mutacija CHMP2B (engl. *chromatin modifying protein*; bjelančevina izmjene kromatina) unutar kompleksa ESCRT-III kod skupine pacijenata s frontotemporalnom demencijom, koja je poslije Alzheimerove bolesti najpoznatiji oblik nasljedne demencije, te u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (ALS). Ovim neurodegenerativnim bolestima svojstveno je nakupljanje uklopina ubikvitin pozitivnih bjelančevina u središnjem živčanom sustavu, što sugerira kako mehanizam koji ih uklanjanja mora biti narušen u oštećenim živčanim stanicama (65,66). Nadalje, smanjena količina bjelančevina ESCRT povećava odumiranje živčanih stanica u modelu za Huntingtonovu bolest načinjenom u vinske mušice (67). U transfeciranim HeLa stanicama bjelančevine ESCRT zadužene su za uklanjanje TDP-43 (engl. *TAR DNA-binding protein 43*; bjelančevina koja se veže za TAR DNA 43), glavnog ubikvitiniranog biljega u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi i frontotemporalnoj demenciji s ubikvitin pozitivnim uklopinama (68). Ova otkrića zajedno ukazuju na značaj kompleksa ESCRT za održavanje normalne homeostaze u živčanom sustavu.

#### 1.4. Istraživanje uloge gena

Jedan od osnovnih ciljeva proučavanja gena jest povezivanje strukture gena s ulogom bjelančevine koja je njime određena. Do danas se razvio niz postupaka koji omogućuju uvid u ulogu pojedinih gena.

U uvjetima *in vitro* moguće je stanice potaknuti na pojačani izražaj željenog gena uporabom ekspresijskih vektora koji sadrže točno određene inserte cDNA. U novije vrijeme kao sredstvo za nadzor pojedinih gena u uvjetima *in vitro* koristi se mehanizam RNAi (engl. *RNA interference*; RNA utišavanje). RNAi je tehnika koja inhibira genski izražaj, a njezin je osnovni način djelovanja specifično utišavanje genske poruke, a time i sprečavanje stvaranja odgovarajuće bjelančevine uporabom dvolančanih fragmenata RNA (dsRNA, engl. *double stranded RNA*). To su zapravo male dvolančane molekule RNA koje mRNA cijepaju u kraće lance koji potom ne mogu uzrokovati translaciju bjelančevina. Promjena nastala uspoređivanjem stanica s preizraženim genom, u odnosu na onaj utišani, govori nam o mogućoj ulozi ciljanog gena, odnosno bjelančevine (69).

Istraživanje uloge *in vivo* temelji se na analizi fenotipa mutiranih životinja, nosioca preinake u genu koji je predmet proučavanja. Promjena u fenotipu u životinja sa samo jednim preinačenim genom ukazuje na ulogu samog gena. Danas se u istraživanju uloge gena najčešće koriste glodavci, posebice miševi. S tom svrhom, 2003. godine pokrenut je „Projekt onemogućavanja mišjih gena“ (engl. *Knockout Mouse Project*), s ciljem stvaranja banke genetički preinačenih miševa, koji će imati kao posljedicu uvid u ulogu svih gena miša. Prošle je godine projekt ušao u drugu fazu, u kojem će se uloga gena na genetički preinačenim miševima analizirati testovima ponašanja (70,71,72).

##### 1.4.1. Miš kao pokusni model za istraživanje gena sisavaca

Najčešće korišten pokusni model za istraživanje gena sisavaca je miš (*Mus musculus*). Miševi su relativno mirne, male životinje, prilagođene životu u laboratorijskim uvjetima, stoga su jednostavne za uzgoj i rukovanje. Kratko generacijsko vrijeme i stvaranje velikog broja potomaka kroz cijelu godinu omogućuje brzo dobivanje životinja koje se koriste u istraživanju, a postojanje visokosrođenih linija omogućuje rad na ujednačenoj genetičkoj podlozi (73,74). Budući da je potvrda parenja zaostatak sluznoga čepa u rodnici ženke, što se

može opaziti pregledom rodnice do kasnijih jutarnjih sati, lako se može odrediti dan začeća i pratiti dani trudnoće. Stoga je miš kao pokusni model vrlo važan u području embriologije. Također, važno je napomenuti kako je embrionalni razvoj miša usporediv s ljudskim (75).

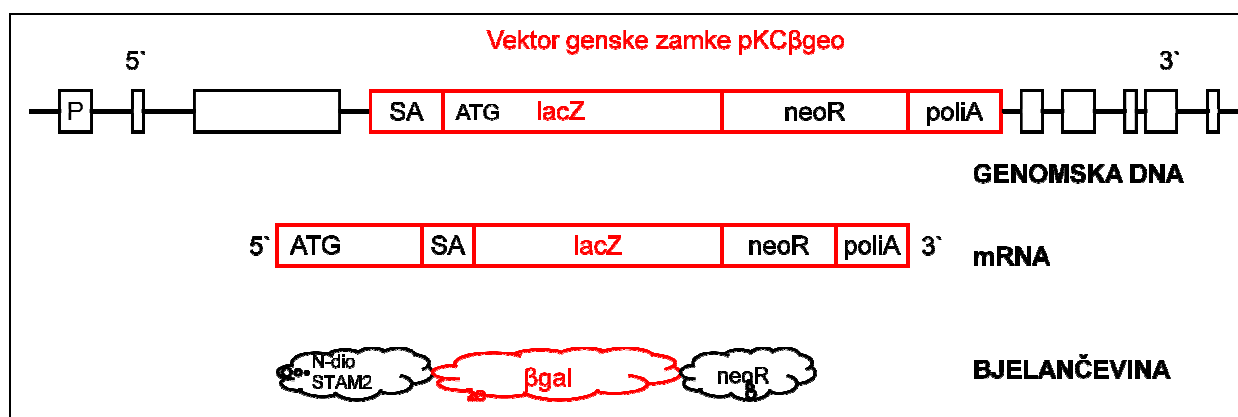
Mišji genom sekvencioniran je i dobro proučen, a postoji čak 95% sličnosti s ljudskim genomom (76). Čovjeku evolucijski bliže životinje, poput majmuna, neusporedivo su skuplje za uzgoj, teže je s njima rukovati, a zbog stvaranja relativno malog broja potomaka i dulje životne dobi, bazična istraživanja bila bi neizvjesna.

### 1.5. Transgenična mišja linija *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*

U provedenom istraživanju, osim mišjih linija divljega tipa, visokosrođene linije C57Bl/6NCrl, te niskosrođene linije CD1, korištena je linija *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* s mutacijom u genu *Stam2* koja je dobivena postupkom genske zamke (77, 78). Trenutno se ova linija uzgaja na genetičkoj podlozi C57Bl/6NCrl. Postupkom genske zamke se u genom embrionalnih matičnih stanica miša elektroporacijom nasumično ugradio vektor genske zamke pKC199βgeo. Vektor genske zamke pKC199βgeo na svom 5' kraju sadrži primač prekrajanja iz mišjeg gena *Hoxc9*. Zatim slijedi gen βgeo, bez vlastitog promotora, koji se sastoji od fuzinoranih gena za enzim β-galaktozidazu *lacZ* („gen biljeg“ koji odražava aktivnost gena uhvaćenog u gensku zamku), te gena za neomicin fosfotransferazu *neoR* („gen izbornik“ koji omogućuje odabir klonova embrionalnih matičnih stanica s ugrađenim vektorom budući da 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 onemogućavanje tog gena (slika 4).

Promijenjene embrionalne matične stanice s ugrađenim vektorom genske zamke odabiru se uzgojem na podlozi s neomicinom, te se vraćaju u mišje blastociste ili morule. Tako nastaju kimerični zameci čije su stanice potekle od embrionalnih matičnih stanica i nose gensku preinaku. Sekvencioniranjem je pokazano kako je vektor genske zamke ubačen u intron između 2. i 3. egzona gena *Stam2* (79). Budući da vektor sadrži gen biljeg *lacZ*, koji je zbog nedostatka vlastitog promotora pod utjecajem gena *Stam2*, praćenje aktivnosti gena *lacZ* može se upotrijebiti za analizu uzorka izražaja uhvaćenog gena.

Mišja linija s promjenom u genu *Stam2* nastala postupkom genske zamke dobila je ime *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*. *Gt* znači da je linija dobivena postupkom genske zamke (engl. *gene trap*), *1* je oznaka koja pokazuje kako je vektor genske zamke ugrađen u jednoj kopiji u mišji genom, a *Gaj* je prema internacionalnom registru laboratorija (engl. *International Laboratory Register, ILAR*) kod za Laboratorij za genetiku i razvojnu genetiku Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji se dodjeljuje prema prezimenu glavnoga istraživača (Gajović) (80). Transgenična mišja linija *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* održavana je križanjem heterozigotnih nosioca preinake s miševima soja C57Bl/6NCrl kroz 24 generacije.



**Slika 4.** Shematski prikaz ugradnje vektora genske zamke pKC199βgeo u intron između 2. i 3. egzona gena *Stam2*. Pomoću primača prekranja (SA, engl. *splice acceptor*) i start kodona (ATG - inicijator transkripcije) vektor ostaje ugrađen u mRNA. Budući da vektor na svom 3' kraju posjeduje poliadenilacijski signal (poliA) dolazi do prekida transkripcije nizvodno od signala. Ukoliko je promotor (P) gena *Stam2* aktivan, dolazi do stvaranja stopljene bjelančevine sastavljene od 14% N-kraja bjelančevine STAM2, β-galaktozidaze (β-gal) i neomicin fosfotransferaze (neoR).

### 1.5.1. Izražaj i moguća uloga gena *Stam2*

Svrha provedenog istraživanja jest pokušati povezati izražaj gena *Stam2*, kao i odgovarajuće bjelančevine, s mogućom ulogom STAM2 u embrionalnom i odraslom živčanom sustavu miša. Budući da je većina dosadašnjih istraživanja vezana uz ulogu gena *Stam2* provedena u uvjetima *in vitro* na kulturi stanica koje nisu živčanog podrijetla (29, 30, 33, 43, 81), sljedeći uvjet neophodan za daljnje razumijevanje uloge tog gena u živčanom sustavu, vezan je uz

njegov izražaj unutar organizma u modelima *in vivo*, te u živčanim stanicama *in vitro*. Sustavna analiza izražaja gena *Stam2* prema literaturnim podacima nije poznata.

Nedavna potvrda povezanosti endosomske disfunkcije s degeneracijom živčanih stanica ukazuje na važnost proučavanja ovog procesa u živčanom sustavu (62, 63, 64). Molekula STAM2 važan je dio procesa endocitoze, pa je temeljno shvaćanje prostorne i vremenske rasprostranjenosti područja izražaja te molekule, nužan preduvjet proučavanja ovog gena na mišjim modelima različitih neurodegenerativnih bolesti. Nadalje, vrlo je važno detaljno razumijevanje mehanizma kompleksa ESCRT i njegovog funkcioniranja, te istraživanje uloge *in vivo* pojedinih bjelančevina tog kompleksa, u kojem STAM2 vjerojatno igra važnu ulogu u obradi signala koji određuju daljnji opstanak ili odumiranje živčanih stanica. Tek nakon takve analize moći će se pristupiti detaljnijem istraživanju značenja bjelančevine STAM2 u nastanku i mogućem liječenju bolesti živčanog sustava.

## 2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog rada jest da je STAM2, koji je uključen unutarstaničnu signalizaciju posredovanu endosomima, izražen u živčanim stanicama, te da je povezan s bjelančevinama kompleksa ESCRT-0. Gen *Stam2* i njegov bjelančevinski produkt prisutni su u ključnim zbivanjima tijekom razvoja živčanog sustava, te u središnjem i perifernom živčanom sustavu miša, a odgovaraju izražaju reporterskog gena *lacZ* u mišjoj liniji *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*.

### 3. CILJEVI RADA

#### 3.1. Opći cilj

Opći cilj istraživanja ovog rada jest određivanje uzorka izražaja gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja, te u odraslom središnjem i perifernom živčanom sustavu miša.

#### 3.2. Specifični ciljevi

Opći cilj uključuje ostvarivanje posebnih ciljeva:

1. Odrediti unutarstanični smještaj bjelančevine STAM2 i povezati ga sa smještajem bjelančevina kompleksa ESCRT-0.
2. Odrediti izražaj gena *Stam2* na razini mRNA postupkom hibridizacije RNA *in situ* u živčanom sustavu, te tijekom embrionalnog razvoja živčanog sustava miša.
3. Odrediti prisutnost bjelančevine STAM2 postupkom imunohistokemije u pojedinim vrstama stanica središnjeg i perifernog živčanog sustava, te tijekom embrionalnog razvoja živčanog sustava miša.
4. Provjeriti odgovara li uzorak izražaja gena *lacZ* u miševima *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* izražaju gena *Stam2* u središnjem i perifernom živčanom sustavu, te tijekom embrionalnog razvoja živčanog sustava miša.
5. Povezati uzorak izražaja gena *Stam2* i smještaj odgovarajuće bjelančevine s mogućom ulogom tog gena.



## 4. UZORCI I POSTUPCI

### 4.1. Pokusne životinje

U ovom su radu upotrijebljeni mišji zamci i odrasli miševi oba spola visokosrođene linije C57Bl/6NCrI, niskosrođene linije CD1, te transgenične linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup> s preinačenim genom *Stam2* dobivenim postupkom genske zamke, na genetičkoj podlozi C57Bl/6NCrI. Ukupno je za pokuse žrtvovano 20 odraslih ženki i 47 odrasla mužjaka, te 10 legla novorođenih miševa (70 miševa starosti P0).

### 4.2. Postupci sa životinjama

#### 4.2.1. Parenje životinja

Kako bi se dobili zametci odgovarajuće starosti, dvije do tri ženke stavljene su u kavez s jednim mužjakom. Svakog je jutra bila pregledana rodnica sparenih ženki kako bi se utvrdila prisutnost sjemene tekućine u obliku vaginalnog čepa. Budući da se ženke pare tijekom ovulacije koja je kod miševa svakog četvrtog dana, nalaz vaginalnog čepa odgovara početku trudnoće.

Kako bi se održavala transgenična mišja linija *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup>, križane su jedinke iz visokosrođene linije C57Bl/6NCrI s heterozigotnim nosiocima mutacije u genu *Stam2*.

#### 4.2.2. Žrtvovanje životinja

Životinje predviđene za izolaciju zametaka, kao i one predviđene za izolaciju organa za provedbu tehnike hibridizacije RNA *in situ* žrtvovane su postupkom cervikalne dislokacije. Cervikalna dislokacija je postupak koji kod životinja izaziva trenutnu smrt i minimalnu bol. Nagli pokret povlačenja repa miša, uz istovremeno držanje glave životinje u nepomičnom položaju, dovodi do prekida kralježnične moždine u području vrata, te trenutne smrti.

Životinje predviđene za izolaciju organa namijenjenih imunohistokemijskom određivanju bjelančevina, te histokemijskom određivanju aktivnosti β-galaktozidaze, prije zahvata su

uspavane iniciranjem anestetika Avertina (0,5 g/kg) u peritonealnu šupljinu. Nakon uspavlivanja životinje uslijedi postupak fiksiranja perfuzijom, unutar kojega u trenutku otvaranja prsne šupljine, nastupa bezbolna smrt za životinju.

Novorođeni miševi predviđeni za izolaciju kore velikog mozga u svrhu kultiviranja živčanih stanica, žrtvovani su dekapitacijom odmah po rođenju. Sterilnim škarama glava je odvojena od ostatka tijela i prebačena u 70% etanol. Tijekom postupka dolazi do bezbolne smrti životinja.

#### **4.2.3. Izolacija i određivanje starosti zametaka**

Kako bi se dobili zameci odgovarajućeg stadija, trudna mišica žrtvovuje se točno određeni dan, računajući od dana oplodnje. Kao početak oplodnje računao se dan kada je kod trudne mišice pronađen vaginalni čep. Taj se dan označavao kao dan kada je zametak star 0,5 dana, budući da se miševi pare noću, u vrijeme oslobađanja jajnih stanica. Osim određivanja dobi zametaka praćenjem vaginalnih čepova, potvrda se dobila brojanjem somita, te promatranjem vanjskih osobina zametaka. Starost zametaka izražena u danima uspoređivana je s razvojnim stadijima po Theileru (82).

U odgovarajućim danima starosti zametaka, trudne su mišice žrtvovane postupkom cervikalne dislokacije. Nakon otvaranja trbušne šupljine, odvojeni su rogovi maternice sa zamecima, a zatim su prenijeti u posudu s fosfatnim puferom PBS (engl. *phosphate buffered saline*; 0,154 M NaCl, 2,26 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,74 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) u kojem su zameci odvojeni od svojih ovojnica.

#### **4.2.4. Uzimanje uzorka vrška repa**

U svrhu dobivanja dostatne količine molekule DNA, potrebne za određivanje genotipa mišje linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*, uzimao se uzorak vrška repa miša. Ovim postupkom životinja se imobilizirala rukom, te joj je odrezan vršak repa veličine 0,5 cm. Budući da je bol kratkotrajna, a krvarenje neznatno, ukupan stres za miša može se usporediti s onim prilikom davanja injekcije. Stoga za postupak nije primjenjena anestezija, niti je bila potrebna postoperativna skrb.

### 4.3. Postupci sa stanicama

Cijeli postupak kultiviranja stanica izveden je u sterilnim uvjetima. Instrumenti i pribor sterilizirani su prije uporabe suhom sterilizacijom, 4 sata pri 180°C.

#### 4.3.1. Primarna stanična kultura živčanih stanica kore velikog mozga

Nakon dekapitacije novorođenih miševa, mozak je pomoću sterilne špatule izvađen i uronjen u posudu s hladnom otopinom Hanks BSS (engl. *balanced salt solution*, uravnotežena otopina soli). Iz mozga je potom izdvojena regija kore velikog mozga, a tkivo je u komori za sterilni rad škalicama mehanički usitnjeno. Otopina Hanks BSS je potom zamijenjena otopinom proteolitičkog enzima akutaze (Gibco). Smjesa stanica i akutaze, koja omogućuje nježno odvajanje stanica, inkubirana je 15 minuta pri 37°C uz povremeno miješanje. Nakon 6 minuta centrifugiranja na 1000 x g (Eppendorf Centrifuge, 5810R), nadtalog je izliven, a talog raspršen u svježe pripremljenom hranjivom mediju za diferencijaciju živčanih stanica (D-MEM/F-12 + GlutaMAX univerzalni medij za kultiviranje stanica, N2 suplement 1X, B27 suplement 1X, penicilin/streptamicin 1X; Gibco). Suspenzija sa stanicama zasađena je u koncentraciji od  $0,4 \times 10^6$  stanica/ml, u pločice sa šest bunarića (Nunc) za postupak substanične frakcionacije ili u pločice s 24 bunarića (Nunc) za postupak imunocitokemije. Pločice su prethodno tretirane poly-D-lizinom (koncentracije 0,1 mg/ml, 18 sati pri 37°C; Sigma), te lamininom (koncentracije 10 µg/ml, 4 sata pri 37°C; Sigma). Nakon 24 sata na pločicama se mogu uočiti prihvaćene stanice u početnom stupnju diferencijacije. Stanice su uzgajane 6 dana u kulturi (u inkubatoru tvrtke Binder pri 37°C, u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>), uz mijenjanje medija svakih 1-2 dana.

### 4.4. Postupci s DNA

#### 4.4.1. Izolacija DNA

U svrhu određivanja genotipa mišje linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*, DNA je izolirana iz uzorka vrška mišjeg repa. Odrezani vršak repa uronjen je u 500 µl pufera za razgradnju tkiva (engl. *lysis buffer*; 100 mM Tris-HCl, pH8.0 (Tris = trishidroksimetilaminometan), 5 mM EDTA

(etilendiamintetraoctena kiselina), 0,2% SDS (natrijdodecilsulfat), 200 mM NaCl), kojem je dodano 100 µg/ml proteinaze K. Uzorak tkiva ostavljen je u puferu, preko noći pri 56°C. Sljedeće jutro, tkivo je centrifugirano 20 minuta, pri brzini od 14000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415C). U odvojeni nadtalog stavljena je ista količina (500 µl) izopropanola. Nakon laganog miješanja, uzorak je istaložen centrifugiranjem na 14000 x g kroz 5 minuta. Nakon odstranjivanja nadtaloga, DNA je isprana dva puta s 1 ml 70% etanola, te ponovno centrifugirana na 14000 x g, 5 minuta. Nakon zadnjeg centrifugiranja, alkohol je izbačen, a uzorak DNA ostavljen sušiti na zraku u otvorenim mikroepučetama, dok je ostatak alkohola potpuno ishlapio. Tako izolirana DNA otopljena je u 50 µl sterilne vode.

#### 4.4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Genotipizacija zametaka učinjena je metodom lančane reakcije polimerazom. Lančana reakcija polimerazom (engl. *PCR*; *polymerase chain reaction*) brza je i specifična metoda u kojoj se odabrani odsječci DNA umnažaju u velikom broju kopija. Kao kalup za umnažanje korištena je DNA izolirana iz vrška repa miša. Reakcijska smjesa sastojala se od:

- 200 nmol početnica
- 200 µmol smjese nukleotida (dNTP)
- 2mM MgCl<sub>2</sub>
- 1X pufer za DNA polimerazu
- 1,25 jedinice Go Taq DNA polimeraze (Promega)
- 1 µl uzorka DNA

Početnice korištene za genotipizaciju transgenične mišje linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup> bile su 5'-TTATGGCTTTTAGGCAATCT-3' i 5'-GCTTTACAGTGGGGATACAT-3' za normalan alel *Stam2*, te 5'-TTATGGCTTTTAGGCAATCT-3' i 5'-CTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3' za alel *Stam2* s ugrađenim vektorom genske zamke. Ukupan volumen reakcijske smjese bio je 50 µl.

Reakcija se odvijala u stroju za lančanu reakciju polimerazom (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler) pod sljedećim uvjetima: početna denaturacija uzoraka 2 minute pri 95°C, nakon toga 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije (10 sekundi pri 95°C), lijepljenja

početnica (30 sekundi pri 56°C), i produljivanja lanaca (90 sekundi pri 72°C), te završne polimerizacije svih nedovršenih lanaca DNA, 7 minuta pri 72°C.

#### **4.4.3. Elektroforeza DNA na agaroznom gelu**

Rezultati lančane reakcije polimerazom provjereni su elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Za pripravu gela, agaroz (Promega) je pomiješana zajedno s puferom za elektroforezu (89 mM Tris-HCl, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA, pH 8.0). Nakon zagrijavanja u mikrovalnoj pećnici, smjesa je ohlađena pri 50 °C, te joj je dodano 10 mg/ml etidij-bromida. Nakon polimerizacije, u kadici za elektroforezu stavljen je pufer za elektroforezu, te su naneseni uzorci DNA. Elektroforeza se odvijala pod naponom 10-15 mV/cm gela.

#### **4.5. Hibridizacija RNA *in situ* upotrebom radioaktivno obilježenih izotopa**

Postupak hibridizacije RNA *in situ* koristio se za detekciju mRNA u morfološki očuvanim rezovima tkiva, pomoću označenih fragmenata nukleinskih kiselina koji se specifično vežu za komplementarnu sekvencu u tkivu.

##### **4.5.1. Izolacija i rezanje organa ili zametaka na kriostatu**

Životinje čiji su organi ili cijeli zameci bili namijenjeni analizi uzorka izražaja gena *Stam2* postupkom hibridizacije RNA *in situ* žrtvovane su postupkom cervikalne dislokacije. Cijeli postupak u okviru ove metode izveden je u sterilnim uvjetima i sa sterilnim instrumentima. Nakon izolacije organa ili zametaka, tkivo je u vrlo kratkom vremenu smrznuto u izopentanu (Sigma), prethodno ohlađenim pri -80°C. Smrznuto tkivo bilo je pohranjeno pri -80°C do trenutka rezanja.

Neposredno prije rezanja, uzorci smrznutog tkiva i zameci uklopljeni su u ljepilo za tkivo (Tissue-Tek, Sakura), a kriostat (Leica CM1850) je ohlađen pri -20°C. Rezovi debljine 20 µm postavljaju se na predmetna stakla presvučena poly-l-lizinom (Menzel-Glaser). Stakla s uzorcima pohranjena su pri -20°C do uporabe, bez prethodne fiksacije.

#### 4.5.2. Fiksacija tkiva

Predmetna stakla sa smrznutim rezovima uzorka fiksirana su na dan izvođenja hibridizacije RNA *in situ*. Nakon što su stakla izvađena s  $-20^{\circ}\text{C}$ , uronjena su na 10 minuta u fiksativ sastavljen od 2% paraformaldehida (Sigma) u fosfatnom puferu PBS, pH 7.4, koji je prethodno ohlađen pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Nakon fiksacije, stakla su ispirana u sljedećim otopinama pri sobnoj temperaturi: 2 puta po 20 sekundi u puferu PBS, 10 minuta u puferu TEA (TEA = trietanolamin; 0,1 M trietanolamin, 0,154 M NaCl), pH 8.2, kojem je dodan kiseli anhidrid (Sigma), te u uzlaznom nizu etanola (1 minuta u 70% etanolu i 80% etanolu, 2 minute u 95% etanolu, te 1 minuta u apsolutnom etanolu). Potom su stakla uronjena 5 minuta u kloroform, te po 1 minutu u apsolutni i 95% etanol. Nakon što su stakla s rezovima izvađena iz etanola, ostavljena su na zraku kako bi se osušila.

#### 4.5.3. Označavanje sonde DNA radioaktivno obilježenim sumporom ( $^{35}\text{S}$ -dATP)

Sonda DNA korištena za detekciju mRNA gena *Stam2* bila je: 5'-CCTCTGTGATTTTCTCCTTGCCACCAGTTGGCGTCACTGTCATCC-3' („*antisense*“ sekvenca). Kao kontrola bila je korištena komplementarna sekvenca („*sense*“ sekvenca): 5'-GGATGACAGTGACGCCAACTGGTGGCAAGGAGAAAATCACAGAGG-3'.

Označavanje sonde odvijalo se u mikroepreveti na ledu, budući da je enzim terminalna transferaza vrlo termolabilan.

Sastojci reakcijske smjese po jednoj reakciji bili su:

- 2  $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -dATP, radioaktivnosti 50  $\mu\text{Ci}$  (Perkin Elmer)
- 1  $\mu\text{l}$  sonde DNA, koncentracije 2,5 pmol/ $\mu\text{l}$  (Microsynth)
- 1  $\mu\text{l}$  pufera za terminalnu transferazu (Roche)
- 0.5  $\mu\text{l}$   $\text{CoCl}_2$  (Roche)
- 1  $\mu\text{l}$  enzima terminalna transferaza (Roche).

Reakcijska smjesa je potom lagano pomiješana, te inkubirana u vodenoj kupelji pri  $37^{\circ}\text{C}$  kroz 30 minuta. Nakon 30 minuta reakcija označavanja sonde zaustavljena je dodavanjem 180  $\mu\text{l}$  TE (TE = Tris-EDTA; 10.0 mM Tris, 1.0 mM EDTA) pufera i 4  $\mu\text{l}$  t-RNA (engl. *transfer RNA*, prijenosna RNA, Roche), koncentracije 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Slijedio je postupak taloženja DNA iz

reakcijske smjese dodavanjem 15 µl 4 M NaCl zajedno sa 660 µl apsolutnog etanola. Nakon snažnog miješanja, reakcijska smjesa je inkubirana sat vremena na suhom ledu pri temperaturi od -80°C. Slijedilo je centrifugiranje u hladnoj centrifugi pri 4°C, 30 minuta na 13 000 x g. Nakon centrifugiranja, uklonjen je nadtalog, a stvoreni talog otopljen je u 50 µl TE pufera kojem je dodan 0,5 M DTT (ditiotreitol, Sigma). Ovako otopljena DNA predstavljala je sondu označenu radioaktivnim sumporom (<sup>35</sup>S-dATP). Uspješnost vezivanja <sup>35</sup>S-dATP za oligonukleotid mjerena je scintilacijskim brojačem (Packard 1600TR, Liquis Scintillation analyzer), dodavanjem 1 µl označene sonde u 500 µl scintilacijske tekućine (Packard). Iz dobivenih podataka izračunat je postotak uspješnosti označavanja sonde radioaktivnim sumporom, kao i broj konjugiranih <sup>35</sup>S-dATP po oligonukleotidu.

#### **4.5.4. Hibridizacija označene sonde s tkivom**

1250 µl hibridizacijskog pufera pH 7.4 pomiješano je sa 125 mg dekstran sulfata (Sigma) i 12,5 µl 1 M DTT. Hibridizacijski puffer pripremljen je unaprijed i pohranjen je pri -20°C do uporabe, a sastojao se redom od sljedećih reagensa: 2,0 ml 20X pufera SSC (engl. *saline sodium citrate*; slani natrijev citrat; 3,0 M NaCl, 300 mM trinatrijcitratdihidrat, 2,0 ml 1 M fosfatni puffer PB (eng. *phosphate buffer*; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); pH 6.5, 0,8 ml 50x Denhardt otopine (Sigma), 0,4 ml t-RNA (25 mg/ml), 1,0 ml jednolančane DNA iz sperme lososa (Sigma), 0,4 ml 0,1 M EDTA; pH 8.0, 0,04 ml 10% SDS (natrijdodecilsulfat), te 33,396 ml sterilne vode.

Pripremljena hibridizacijska smjesa inkubirana je u vodenoj kupelji pri 65°C uz povremeno miješanje. Nakon 20 minuta smjesi je dodan određeni volumen označene sonde koji je odgovarao dozi od 600,000 - 800,000 cpm/50 µl. Potom je smjesa inkubirana završnih 10 minuta pri istoj temperaturi. Aktivnost hibridizacijskog pufera ponovno je provjerena mjerenjem na scintilacijskom brojaču, dodavanjem 10 µl pripremljene hibridizacijske smjese u 500 µl scintilacijske tekućine. Tako pripremljeni puffer trebao bi mjeriti između 120,000 i 160,000 cpm.

Stakla s rezovima tkiva koja su prethodno osušena na zraku stavljena su u vlažnu komoru za inkubaciju, nakapana su s 50 µl hibridizacijske smjese po rezu, te pokrivena pokrovnim

stakalcem. Komora je potom dobro zatvorena i stavljena u termostat (BTE-S, Termo medicinski aparati) pri 53°C kroz 18 sati.

#### **4.5.5. Ispiranje rezova nakon hibridizacije**

Nakon što se hibridizacija odvijala preko noći pri 53°C, pokrovna stakalca su oprezno skinuta, a stakla s rezovima isprana 3 puta po 1 minutu u 0,5X SSC puferu, prethodno zagrijanim pri 53°C, kojem je dodan 1M DTT. Slijedila su 2 ispiranja po 15 minuta u 0,5X SSC puferu prethodno zagrijanim pri 60 °C kojem je dodan 1M DTT, te 2 ispiranja po 15 minuta u 0,5X SSC puferu prethodno zagrijanim pri 60 °C. U zadnjem SSC puferu rezovi su ostavljeni 30 minuta. Na kraju su izvedena kratka ispiranja (20 sekundi) pri sobnoj temperaturi, a sastojala su se redom od: 2 ispiranja u 0,5 X SSC puferu, 2 ispiranja u destiliranoj vodi, te 2 ispiranja u 70% etanolu. Potom su rezovi ostavljeni nekoliko sati pri sobnoj temperaturi kako bi se dobro osušili.

#### **4.5.6. Autoradiografija**

Stakla s osušenim rezovima položena su zajedno s <sup>14</sup>C-mikroskalom, koja je služila kao kontrola ekspozicije filma, u kazetu za razvijanje. U tamnoj prostoriji na stakla je položen autoradiografski film (Kodak BioMax MR Film), a kazeta je zatvorena i pohranjena u tamnoj prostoriji.

Nakon 2 tjedna, film je oprezno izvađen iz kazete, te razvijen u tamnoj prostoriji pod crvenim svjetlom. Film je najprije uronjen 4 minute u posudu s razvijačem, zatim kratko ispran u vodi, sljedećih 20 minuta uronjen je u otopinu s fiksirom, a nakon toga 30 minuta ispran pod mlazom vode. Nakon sušenja, film je skeniran, te analiziran.

#### **4.5.7. Uranjanje tkiva u fotografsku emulziju nakon hibridizacije RNA *in situ***

Nakon analize filma, rezovi s najboljim signalom mogu se dodatno tretirati fotografskom emulzijom. Cijeli postupak rada s fotografskom emulzijom mora se odvijati u potpunom mraku.



Jednaka količina fotografske emulzije (Kodak) i vode pomiješana je i inkubirana 30 minuta pri 45°C. Stakla s rezovima nakratko su uronjena u fotografsku emulziju, te ostavljena sušiti pri sobnoj temperaturi u mraku. Sljedeće jutro stakla su sakupljena u tamnu kutiju, zamotana aluminijskom folijom, te pohranjena pri 4°C sljedeća 3 tjedna.

#### **4.5.8. Vizualizacija reakcije hibridizacije RNA *in situ* na rezovima pomoću fotografske emulzije i bojanje po Nisslu**

Nakon 3 tjedna stakla s rezovima koja su bila tretirana fotografskom emulzijom, izvađena su s 4°C, te temperirana pri sobnoj temperaturi. Razvijač i fiksir bilo je potrebno svježe pripremiti i ohladiti pri 18°C. Stakla su uronjena 3 minute u razvijač, kratko isprana u vodi, zatim uronjena 6 minuta u fiksir, nakon čega su ispirana 15 minuta pod mlazom vode.

Bojanje po Nisslu (krezil-violet) na staklima nakon hibridizacije RNA *in situ* trebalo je biti vrlo slabog intenziteta, kako bi se omogućila vizualizacija srebrnih granula koja predstavljaju pozitivan signal. Bojanje je provedeno pri sobnoj temperaturi pod svjetlom, a sastojalo se od uranjanja stakla po 2 minute u uzlaznom nizu alkohola (70% etanol, 95% etanol, te 2 puta u apsolutnom etanolu). Nakon toga rezovi su prosvjetljeni 2 puta po 5 minuta u butil-acetatu (Sigma). Potom je slijedilo uranjanje rezova po 5 minuta u silaznom nizu etanola (2 puta u apsolutnom etanolu, 95% etanolu i 70% etanolu). Nakon kratkog ispiranja u destiliranoj vodi rezovi su uranjeni na 10 sekundi u razrijeđenu otopinu krezil violet (0,02%, Sigma), nakon čega su ponovno isprana u destiliranoj vodi. Slijedilo je uranjanje u otopine uzlaznog niza etanola, po 1 minutu, te završno prosvjetljivanje u butil acetatu (2 puta po 5 minuta). Rezovi su uz pomoć medija za poklapanje (histomount, National diagnostics) pokriveni pokrovnim stakalcem, te analizirani mikroskopom Olympus AX70.

## **4.6. Postupci s bjelančevinama**

### **4.6.1. Imunohistokemija i imunocitokemija**

Za određivanje prisutnosti i razmještaja pojedinih bjelančevina u tkivu, te lokalizacije istih u stanicima, korištena je metoda imunohistokemije i imunocitokemije. Metoda se temelji na

uporabi ciljno usmjerenih protutijela koristeći osnovni princip u imunologiji kako određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen.

#### **4.6.1.1. Izolacija, fiksacija i rezanje tkiva na kriostatu**

Organi namijenjeni imunohistokemijskom određivanju bjelančevina izolirani su iz životinje, koja je prethodno fiksirana postupkom perfuzije. Nakon izolacije, organi su fiksirani imerzijom (uranjanjem) u istom fiksativu. Jačina fiksativa i duljina fiksacije ovisili su o veličini organa. Mozak je fiksiran 4% paraformaldehidom u fosfatnom puferu PB preko noći pri 4°C, dok su organi probavnog trakta fiksirani 2% paraformaldehidom kroz 3 sata pri 4°C. Zameci su, odmah po izolaciji iz maternice, fiksirani imerzijom u 4% paraformaldehidu preko noći pri 4°C. Primarne kulture živčanih stanica fiksirane su u svježe pripremljenom 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu PBS 15 minuta.

Nakon fiksacije i kratkog ispiranja u fosfatnom puferu PB (2 - 3 puta tijekom 30 minuta), fiksativ je zamijenjen rastućim koncentracijama (10%, 20%, 30%) saharoze u puferu PB, narednih 48 sati, zbog dehidracije i krioprotekcije. Uzorci tkiva pohranjena su u 30% saharozu pri 4°C do trenutka rezanja na kriostatu.

Neposredno prije rezanja, uzorci tkiva ili cijeli zameci uklopljeni su u ljepilo za tkivo (Tissue-Tek, Sakura), a kriostat je ohlađen pri -20°C. Rezovi debljine 20 µm postavljeni su na pozitivno nabijena predmetna stakla (Superfrost Plus, Menzel-Glaser). Stakla s uzorcima pohranjena su pri -20°C do uporabe.

#### **4.6.1.2. Inkubacija s protutijelima**

Neposredno prije inkubacije s protutijelima, stakla s rezovima tkiva ostavljena su jedan sat u eksikatoru, dok su stanice nakon fiksacije bile spremne za uporabu. Nakon ispiranja fosfatnim puferom PBS, rezovi ili stanice su permeabilizirani 10 minuta u otopini 0,2% Triton X-100 (Sigma) u puferu PBS, te potom uronjeni u otopinu za blokiranje (5% serum odgovarajuće vrste u puferu PBS s 0,2% Triton X-100), kako bi se spriječilo nespecifično vezanje sekundarnog protutijela. Potom je uslijedila inkubacija s jednim ili više primarnih protutijela

(tablica 1) u otopini koja je sadržavala 2% serum odgovarajuće vrste u puferu PBS s 0,2% Triton X-100. Inkubacija primarnim protutijelima odvijala se preko noći pri 4°C.

Sljedeće jutro, nakon ispiranja puferom PBS uslijedila je inkubacija s jednim ili više odgovarajućih sekundarnih protutijela (tablica 2) u PBS puferu, 2 sata pri sobnoj temperaturi. Budući da su sekundarna protutijela bila fluorescentno obilježena, cijeli daljnji postupak odvijao se u tamnoj prostoriji, a pri korištenju dva različita sekundarna protutijela istovremeno, pazilo se da njihova fluorescencija ne interferira, te da se svako od njih može naknadno promatrati mikroskopom. U nastavku, rezovi i stanice su isprani puferom PBS, te pokriveni medijem za poklapanje, osjetljivim na fluorescenciju (Fluoromount, Sigma). Nakon sušenja, stakla s imunofluorescentno obojanim rezovima ili stanicama promatrana su i analizirana konfokalnim mikroskopom (Zeiss, LSM 510 Meta).

**Tablica 1.** Primarna protutijela upotrijebljena za postupak imunohistokemije.

<b>Primarno protutijelo</b>	<b>Izvor</b>	<b>Razrijeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
AMSH	miš	1/50	Santa Cruz Biotechnology (sc-271641)
c-Kit	koza	1/200	Santa Cruz Biotechnology (sc-1494)
EEA1	miš	1/500	BD Transduction Laboratories (610457)
GFAP	pile	1/300	Abcam (ab4674)
HRS	miš	1/200	Santa Cruz Biotechnology (sc166843)
IBA1	koza	1/500	Abcam (ab5076)
MAP2	pile	1/1200	Abcam (ab5392)
NeuN	miš	1/100	Millipore (MAB377)
O4	miš	1/200	Millipore (MAB345)
PGP 9.5	miš	1/20	Abcam (ab8189)
STAM1	koza	1/100	Santa Cruz Biotechnology (sc- 6919)
STAM2	kunić	1/200	Abcam (ab63372)
STAM2	kunić	1/200	Bioworld Technology (BS1807)
STAM2	kunić	1/200	Santa Cruz Biotechnology (sc-98681)
UBPY	miš	1/50	Santa Cruz Biotechnology ( sc-365481)
β-galaktozidaza	pile	1/250	Abcam (ab9361)

**Tablica 2.** Sekundarna protutijela upotrijebljena za postupak imunohistokemije.

<b>Sekundarno protutijelo</b>	<b>Razrijeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
Alexa Fluor 488 koza anti - kunić IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A11008 )
Alexa Fluor 488 magarac anti - kunić IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A21206)
Alexa Fluor 488 kunić anti - miš IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A11059)
Alexa Fluor 546 kunić anti - pile IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A11040)
Alexa Fluor 546 kunić anti - miš IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A11003)
Alexa Fluor 546 magarac anti - koza IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A11056)
Alexa Fluor 546 kunić anti - koza IgG	1/500 - 1/1000	Invitrogen (A21085)

#### **4.6.2. Substancična frakcionacija**

Metoda substancične frakcionacije provodila se kako bi se izolirale bjelančevine pojedinih staničnih organela, a potom imunobojanjem bjelančevina utvrdila prisutnost bjelančevine STAM2 u pojedinim organelama.

Neposredno prije početka izvođenja ove metode bilo je potrebno napraviti svježe pufere sljedećeg sastava: pufer D (10 mM PIPES (piperazin- N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina), pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM saharoza, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 0,015% digitonin), pufer T (10 mM PIPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 300 mM saharoza, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM EDTA, 0,5% Triton X-100), pufer C (10 mM PIPES, pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tween 40, 0,5% DOC (natrijev deoksiholat), benzoaza (100 jedinica po ml)), pufer L (282 mM Tris, pH 8.5, 4% LDS (litijdodecilsulfat), 20% glicerol, 1 mM EDTA, 100 mM DTT. Puferima su dodani inhibitori proteaza neposredno pred sam postupak frakcionacije. Svi reagensi potrebni za izradu pufera bili su tvrtke Sigma.

Stanice su izvađene iz inkubatora, te kratko isprane hladnim fosfatnim puferom PBS. Cijeli daljnji postupak odvijao se na ledu, kako bi se usporila moguća razgradnja bjelančevina. PBS pufer zamijenjen je potom odgovarajućom količinom pufera D, te su stanice ostavljene na miješalici (Heidolph vibramax 100) pri 4°C. Nakon 15 minuta, tekućina koja je odgovarala citosolnoj frakciji izolirana je u mikroepruvetu, te je smrznuta pri -80°C. Pufer D sadržavao je digitonin, deterdžent koji reagira s kolesterolom te stvara pore koje omogućuju izlazak

otopljenih citosolnih bjelančevina. Stanicama je potom dodan pufer T. Nakon 30 minuta stanice su odstrugane strugačem s podloge, te se zajedno s puferom prenesene u hladnu mikroepuvenu. Slijedilo je centrifugiranje u prethodno, pri 4°C, ohlađenoj centrifugi (Eppendorf Centrifuge 5417R, 10 minuta na 5000 x g). Nadtalog, koji je odgovarao frakciji organela i membrana prenesen je u novu mikroepuvenu, te je smrznut pri -80°C. Talogu je dodan pufer C, smjesa je naglo zaleđena i odleđena, kako bi se razbile nukleinske kiseline, a time smanjila viskoznost tekućine i omogućilo lakše razdvajanje frakcija. Smjesa je potom inkubirana 10 minuta pri 4°C, na miješalici velike brzine. Nakon centrifugiranja u hladnoj centrifugi na 6800 x g (10 minuta), nadtalog (frakcija jezgri) je prebačen u novu mikroepuvenu, dok je talogu (frakcija citoskeleta) dodana odgovarajuća količina pufera L. Izolirane frakcije bjelančevina pohranjuju se pri -80°C.

#### **4.6.3. Određivanje koncentracije bjelančevina metodom po Bradfordu**

Koncentracija bjelančevina u uzorcima pojedinih frakcija dobivenih postupkom substanične fraktionacije određena je kolorimetrijskom metodom po Bradfordu. Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije uzorka bjelančevina i Bradford reagensa (BioRad) čiji je osnovni sastojak boja komasi plava (engl. *Coomassie Brilliant Blue G-250*). Intenzitet boje koja nastaje pri reakciji bjelančevina u uzorku s Bradfordovim reagensom pri valnoj duljini od 595 nm mjerila se pomoću spektrofotometra (Eppendorf BioPhotometer plus), a koncentracija proteina je očitana iz baždarne krivulje koja je dobivena mjerenjem apsorbancija niza otopina govedjeg serumskog albumina (BSA; engl. *bovine serum albumine*) poznatih koncentracija (0,1 mg/ml – 1,0 mg/ml).

#### **4.6.4. Elektroforeza bjelančevina na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu**

Elektroforeza na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu korištena je za razdvajanje bjelančevina dobivenih iz različitih staničnih frakcija, na temelju njihove molekularne mase. Bjelančevine su obrađene pomoću SDS, anionskog deterdenta, koji disocira i denaturira bjelančevine u linearne polipeptidne lance.

Poliakrilamidni gel, načinjen od gela za razdvajanje (8 - 12% akrilamid/bis-akrilamid, 0,38 M Tris-HCl (pH 8.5), 0,1 % SDS, 0,05% APS (amonijpersulfat), 0,05% TEMED (N,N,N',N'-

tetrametiletilendiamin); Sigma), te gela za sabijanje (4% akrilamid/bis-akrilamid, 0,12 M Tris-HCl (pH 6.8), 0,1 % SDS, 0,05% APS, 0,2% TEMED; Sigma) stavljen je u okomito postavljenu aparaturu za poliakrilamidnu elektroforezu (Bio Rad). Prije nanošenja na gel, 50 µg uzoraka bjelančevina pomiješano je s puferom za nanošenje uzorka (0,04% otopina bromfenol plavo, 15% SDS, 12% 2-merkaptetanol, 20% glicerol, 0,1 M Tris-HCl (pH 6.8)) u omjeru 4:1, te je smjesa zagrijana 5 minuta pri 95°C u svrhu denaturacije. Kao molekularni biljeg upotrijebljen je biljeg elektroforeze (Color Burst Electrophoresis marker, Sigma) pomoću kojeg se naknadno određivala molekularna masa bjelančevine od interesa. Elektroforeza se odvijala u puferu za elektroforezu (0,41 M Tris, 3,84 M glicin, 1% SDS) 2-3 sata uz stalni napon od 120 V.

#### **4.6.5. Prijenos bjelančevina na membranu („western blot“)**

Po završetku elektroforeze, uzorci razdvojenih bjelančevina preneseni su na najlonsku membranu pomoću Bio-Rad sustava za mokri prijenos. U plitku posudu s puferom za prijenos na membranu (0,21 M Tris, 1,92 M glicin, 10% metanol) stavljene su 2 spužvice, 2 filter papira, PVDF (polivinilidenfluorid) najlonska membrana (Sigma), te poliakrilamidni gel. Tzv. „sendvič“ kojeg su redom činili: spužva - filter papir - poliakrilamidni gel - PVDF membrana - filter papir - spužva; oprezno je zatvoren, te stavljen u aparaturu za mokri prijenos, pazeći da njegov položaj u odnosu na elektrode omogući prijelaz negativno nabijenih bjelančevina s poliakrilamidnog gela na membranu. Prijenos bjelančevina s gela na membranu trajao je 55 minuta pri stalnom naponu od 85 V. Nakon završenog prijenosa, membrana je uronjena u Ponceau otopinu (0,1% boja Ponceau S (Sigma), 5% octena kiselina) na 10 minuta, koja omogućuje vizualizaciju bjelančevina, a time i provjeru učinkovitosti prijenosa. Nakon ispiranja membrane destiliranom vodom, tragovi bjelančevina postali su ponovno nevidljivi.

#### **4.6.6. Inkubacija membrane specifičnim protutijelima**

Rezultat prijenosa jest vezivanje bjelančevina za površinu membrane, što omogućuje njihovu detekciju pomoću specifičnih protutijela. Membrana s vezanim bjelančevinama inkubirana je jedan sat u otopini za blokiranje (5% mlijeko u prahu u puferu PBST (engl. *phosphate*

*buffered saline Tween 20*; PBS kojem je dodan 0,05% Tween 20), kako bi se spriječilo nespecifično vezanje bjelančevina za membranu. Slijedila je inkubacija membrane jednim od specifičnih primarnih protutijela (tablica 3) u otopini za blokiranje, preko noći pri 4°C. Nakon ispiranja membrane puferom PBST (4 puta po 10 minuta), membrana je inkubirana 1,5 sati odgovarajućim sekundarnim protutijelom (tablica 4) obilježenim peroksidazom iz hrena, HRP (engl. *horseradish peroxidase*) u otopini za blokiranje. Po završetku inkubacije protutijelima, membrana je isprana (6 puta po 10 minuta) puferom PBST. Vizualizaciju signala omogućila je kemiluminiscentna reakcija peroksidaze uz luminol kao supstrat, pri čemu svjetlost koja je oslobođena u reakciji ostavlja signal na fotografskom filmu. Na membranu su ravnomjerno nanesene dvije otopine kompleta za kemiluminiscentnu detekciju (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). Nakon inkubacije supstratom koja je trajala 5 minuta, membrana je omotana najlonskom folijom, te je zajedno s fotografskim filmom (Kodak BioMax light film) stavljena u kazetu za eksponiranje. Ekspozicija je trajala od nekoliko sekundi do 5 minuta, ovisno o jačini signala, a reakcija se do razvijanja filma odvijala u potpunom mraku. Film je razvijen na jednaki način kao i kod metode radioaktivno obilježene hibridizacije *in situ*.

**Tablica 3.** Primarna protutijela upotrijebljena za postupak prijenosa bjelančevina na membranu („western blot“).

<b>Primarna protutijela</b>	<b>Izvor</b>	<b>Razrijeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
Actin	miš	1/50000	Millipore (MAB1501)
GAP-43	kunić	1/14000	Novus Biologicals (NB300-143SS)
NeuN	miš	1/500	Millipore (MAB377)
STAM2	kunić	1/1000	Abcam (ab63372)
STAM2	kunić	1/1000	Bioworld Technology (BS1807)
STAM2	kunić	1/1000	Santa Cruz Biotechnology (sc-98681)
VEGF	kunić	1/5000	Abcam (ab46154)

**Tablica 4.** Sekundarna protutijela upotrijebljena za postupak prijenos bjelančevina na membranu („western blot“).

<b>Sekundarno protutijelo</b>	<b>Razrijeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
koza anti-miš IgG - H&L (HRP)	1/2000	Abcam (ab6789)
koza anti - kunić IgG - H&L (HRP)	1/2000	Abcam (ab6721)

#### **4.7. Histokemijsko određivanje aktivnosti $\beta$ -galaktozidaze**

Budući da transgenična mišja linija *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* sadrži gen biljeg *lacZ*, praćenje aktivnosti gena *lacZ*, koji kodira za enzim  $\beta$ -galaktozidazu, može se upotrijebiti za analizu uzorka izražaja gena uhvaćenog postupkom genske zamke, što bi u ovom slučaju bio gen *Stam2*.

##### **4.7.1. Izolacija, fiksacija i rezanje organa ili zametaka**

Organi namijenjeni histokemijskom određivanju aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze izolirani su iz životinja koje su prethodno fiksirane postupkom perfuzije. Fiksativ korišten za ovu metodu sastavljen je od 2% formaldehida (Sigma) i 0,2% gluteraldehida (Sigma) u fosfatnom puferu PBS. Nakon izolacije, organi su fiksirani imerzijom u istom fiksativu, jedan sat pri 4°C. Zameci su odmah po izolaciji iz maternice uronjeni u fiksativ. Nakon fiksacije, uzorci tkiva isprani su fosfatnim puferom 4 puta u naredna 2 sata.

Nakon fiksacije i ispiranja, uzorci tkiva i cijeli zameci rezani su skalpelom na rezove debljine 1 mm, vibratomom (Vibratome 1000 plus Sectioning system) na rezove debljine 100-300  $\mu$ m ili kriostatom (Leica CM1850) na rezove debljine 50 - 60  $\mu$ m. U slučaju rezanja kriostatom, uzorci su uklopljeni u ljepilo za tkivo (Tissue-Tek, Sakura), a kriostat je ohlađen pri -20°C. Rezovi su postavljani na pozitivno nabijena predmetna stakla (Superfrost Plus, Menzel-Glaser), te su ostavljeni pri sobnoj temperaturi 1 - 3 sata. Nakon sušenja, rezovi su bili spremni za uporabu.



Dijelovi tkiva probavnog sustava namijenjeni kvantitativnoj morfološkoj analizi pripremljeni su tako da su se sluznica i podsluznica špatulom odvojile od ostalih slojeva debelog crijeva. Takvi preparati nisu dodatno rezani.

#### 4.7.2. Inkubacija sa supstratom X-gal

Uzorci su inkubirani u otopini boje X-gal (0,5 mg/ml X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 10 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,01% natrijev deoksiholat, 0,01% Igepal; Sigma) 18 sati pri temperaturi 37°C. Nakon inkubacije u navedenoj otopini boje, uzorci su isprani u puferu PBS svakih 30 minuta u naredna 3 - 4 sata. Uzorci rezani skalpelom ili vibratomom nakon ispiranja su prosvijetljeni u rastućim koncentracijama glicerola (20%, 50% i 70% glicerol), potom su kistom prebačeni na predmetno staklo, te su pomoću medija za pokrivanje vodenih preparata (Aquatex, Merck) poklopljeni pokrovnim stakalcem. Kriorezovi, koji su već bili zalijepljeni na predmetnom staklu, nakon ispiranja su prosvijetljeni u otopini histoklir (Histoclear, National diagnostics), te su pomoću medija za uklapanje (Histomount, National diagnostics) poklopljeni pokrovnim stakalcem.

Preparati su analizirani uz pomoć lupe Olympus SZH10, te mikroskopa Olympus AX70.

#### 4.8. Kvantitativne morfološke analize

Kvantitativne morfološke metode učinjene su kako bi dobili uvid u moguću ulogu bjelančevine STAM2 u enteričkom živčanom sustavu.

##### 4.8.1. Fenotipska analiza homozigotnih i heterozigotnih životinja transgenične mišje linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup>

Preparati mišićnog sloja koji obuhvaća mijenterički pleksus, dobiveni struganjem sluznice i podsluznice, bojani su otopinom X-gala, te su upotrijebljeni za procjenu volumne gustoće područja obojanih X-galom, prema već opisanoj metodi (83). Dijelovi mišićnog sloja (3 cm<sup>2</sup>) uzeti su iz dviju životinja po genotipu (*Stam*<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup> i *Stam2*<sup>+ /Gt1Gaj</sup>). U svakom su uzorku naizmjenično određena 10 polja, svako površine 1,3 mm<sup>2</sup>. Volumna gustoća izračunata je tako

da je podijeljen broj točaka stereološke mreže koje se preklapaju s područjem od interesa ( $P_{(I)}$ , područja obojana X-galom) s brojem točaka stereološke mreže koje postoje u referentnom području ( $P_{(ref)}$ , mišićni sloj). Gustoća stereološke mreže (broj točaka), broj preparata, kao i broj polja uzoraka izabrana su kako bi se dobio procijenjeni koeficijent pogreške manji od 0,1 (84).

#### **4.8.2. Fenotipska analiza homozigotnih životinja transgenične miše linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* i životinja divljeg tipa**

Uzorci debelog crijeva, svaki veličine 1 cm, uzeti su iz dviju životinja po genotipu (*Stam<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>* i *Stam2<sup>+/+</sup>*). Imunobojanje protutijelom koje boji živčane stanice (MAP2) provedeno je na sedam nasumično uzetih kriorezova po svakoj životinji. Gustoća stereološke mreže (broj točaka), broj preparata, kao i broj polja uzoraka izabrana su kako bi se dobio procijenjeni koeficijent pogreške manji od 0,1 (84). Volumna gustoća MAP2-pozitivnih područja u 0,2 mm<sup>2</sup> referentnog područja mišićnog sloja izračunata je tako da je podijeljen broj točaka mreže koje su se preklapale s područjem od interesa ( $P_{(I)}$ , MAP2-pozitivna područja) s brojem točaka mreže koje postoje u referentnom području ( $P_{(ref)}$ , mišićni sloj), kako je već prethodno opisano (83).

#### **4.8.3. Statistička analiza**

Sva mjerenja volumnih gustoća, X-gal-pozitivnih područja, te MAP2-pozitivnih područja oba genotipa (homozigota i heterozigota, te homozigota i divljeg tipa) upotrijebljena su kako bi se testirala distribucija uzorka Kolmogoro-Smirnov testom, te Shapiro-Wilk testom.

Uzorci koji su imali normalnu distribuciju (X-gal pozitivna područja) statistički su analizirani Studentovim *t* testom ( $P < 0,1$ ), dok su uzorci koji nisu slijedili normalnu distribuciju (MAP2-pozitivna područja) analizirani neparametrijskim Mann-Whitney U testom ( $P < 0,1$ ). Analiza varijance (ANOVA) ili Kruskal-Wallis ANOVA upotrijebljene su kako bi se usporedile srednje vrijednosti pojedinih životinja i potvrdile jednakost varijanaca izračunatih usporedbom dviju grupa genotipa.

## 5. REZULTATI

### 5.1. STAM2 na staničnoj razini u živčanom sustavu miša

#### 5.1.1. Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama

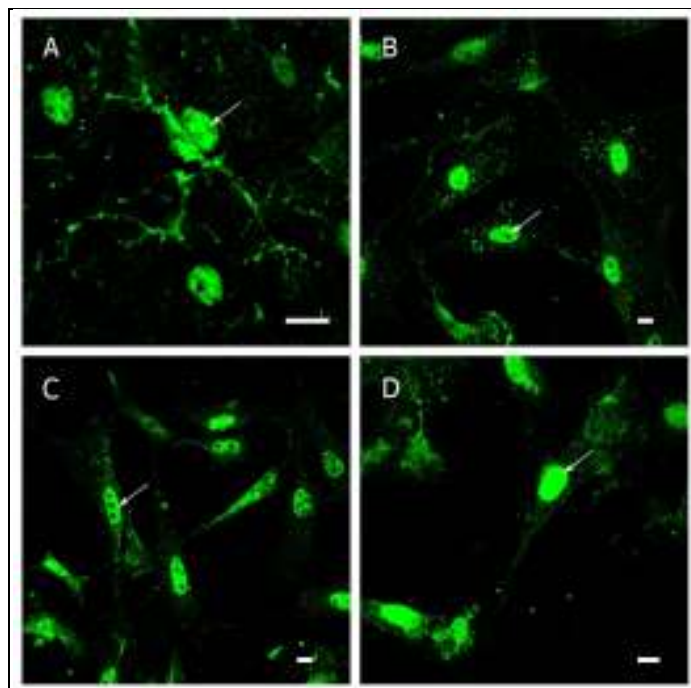
Kako bi se provjerilo je li STAM2 prisutan u živčanim stanicama učinila se primarna kultura živčanih stanica i odredilo prisustvo STAM2 postupkom imunohistokemije, te imunobojanja bjelančevina na membrani („western blot“).

Vizualizacija smještaja STAM2 u primarnim kulturama živčanih stanica kore velikog mozga ostvarena je imunocitokemijskim bojanjem. Stanice su imunoboje primarnim protutijelom specifičnim za bjelančevinu STAM2 koristeći princip da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen.

Specifičnost STAM2 protutijela potvrđena je analizom imunobojanja bjelančevina izoliranih iz živčanih stanica na membrani. Iz rezultata postupka vidljiv je nalaz bjelančevine molekularne mase nešto veće od 58 kDa (što je očekivana masa normalne bjelančevine STAM2), koja reagira na specifično protutijelo za STAM2. Ova veličina predstavlja ubikvitiniran oblik bjelančevine STAM2. Također, specifičnost STAM2 protutijela potvrđena je i postupkom imunohistokemije, tzv. negativnim kontrolama koje su sastavljene od otopine za blokiranje bez primarnog protutijela, te otopine za blokiranje bez primarnog i sekundarnog protutijela zajedno. Budući da je na stanicama na kojima su nanesene negativne kontrole signal izostao, signal dobiven primarnim protutijelom STAM2 zajedno s odgovarajućim sekundarnim protutijelom može se smatrati specifičnim.

Imunohistokemijsko bojanje živčanih stanica pokazalo je kako je bjelančevina STAM2 prisutna difuzno u citoplazmi, kako u perikarionu, tako i u nastavcima živčanih stanica, u obliku točkastog signala. Također, homogeni signal vidljiv je i u jezgri stanice (slika 5).

Ovim je pokusom dokazano kako je bjelančevina STAM2 prisutna u živčanim stanicama.



**Slika 5.** Imunobojanje protutijelom specifičnim za STAM2. (A) Kriorez odraslog mozga imunobojan STAM2 protutijelom. (B, C, D) Primarne kulture živčanih stanica kore odraslog mozga imunoboijane komercijalnim STAM2 protutijelom različitih proizvođača; Bioworld Technology (B), Abcam (C) i Santa Cruz Biotehnology (D). Strelice pokazuju signal u jezgri stanica. Crta mjerila - 10  $\mu$ m.

### 5.1.2. Bjelančevina STAM2 smještena je na endosomima živčanih stanica kao dio kompleksa ESCRT-0

Budući da je na staničnim linijama pokazano kako STAM2 djeluje kao dio kompleksa ESCRT-0, njegova pretpostavljena uloga je u početnom dijelu razvrstavanja ubikvitiranih bjelančevina unutar endosoma, koje se kasnije prosljeđuju u lizosome. Kako bi se provjerilo je li STAM2 uistinu vezan uz membranu ranih endosoma, kao dio kompleksa ESCRT-0 i u živčanim stanicama, kulture primarnih živčanih stanica kore velikog mozga su fiksirane, te je na njima učinjeno dvostruko imunocitokemijsko bojanje. Kolokalizacija bjelančevina metodom dvostrukog imunocitokemijskog bojanja omogućuje istodobnu detekciju više različitih antigena na istom preparatu. Posebnost ove metode je istovremeno korištenje dva različita primarna protutijela na koja se vežu odgovarajuća sekundarna, fluorescentno obilježena protutijela. Pri obilježavanju sekundarnim protutijelima važno je da su ona ciljano usmjerena na IgG životinjske vrste u kojoj je primarno protutijelo proizvedeno, te da su ona

različitih eksitacijskih valnih duljina (488 nm ili 546 nm), tj. da njihova fluorescencija ne interferira.

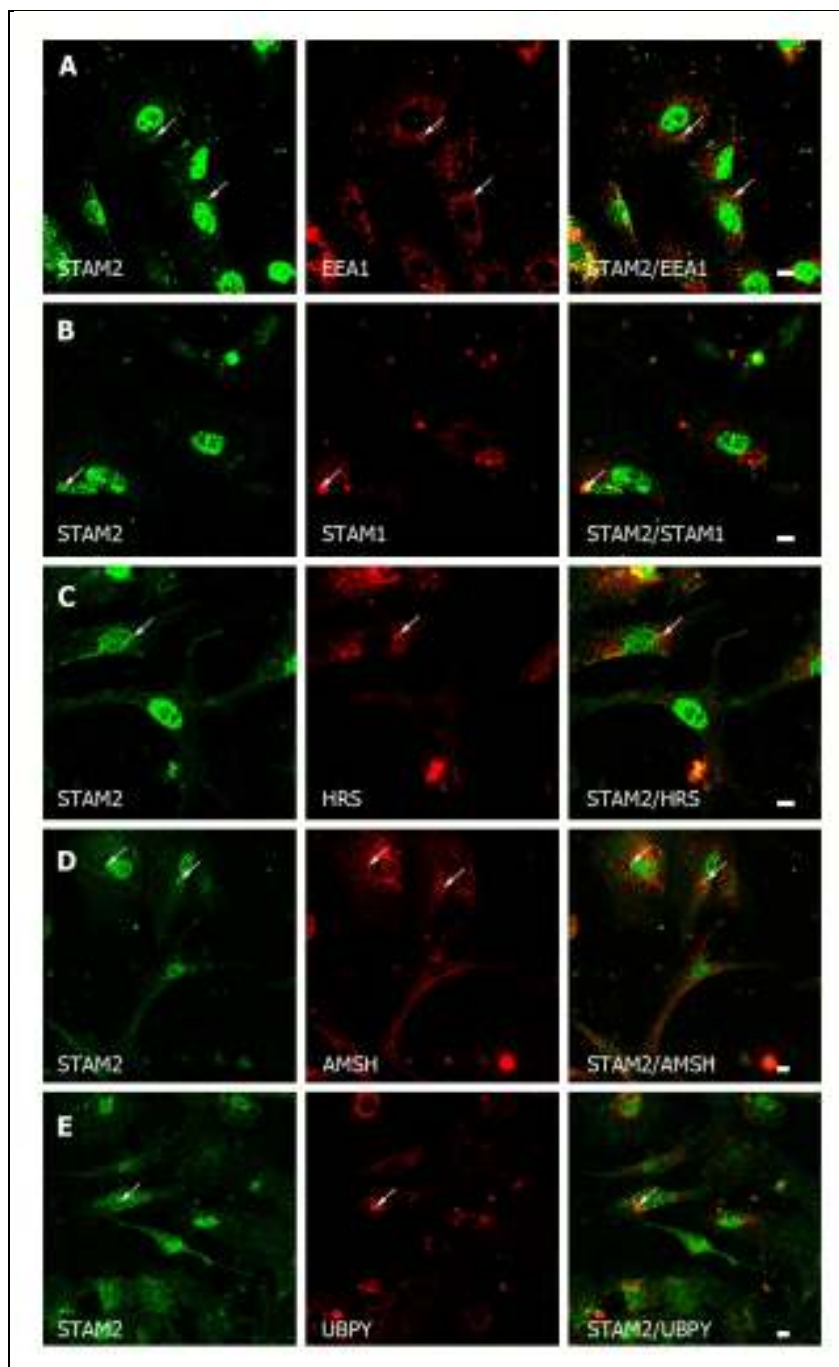
Dvostruko imunocitokemijsko bojanje sa STAM2 protutijelom, te EEA1 protutijelom (engl. *early endosome antigen 1*; antigen ranih endosoma 1), kao biljegom ranih endosoma, pokazalo je kako je STAM2 smješten u točkastim strukturama unutar citoplazme koje su velikim dijelom pozitivne na EEA1.

Kako bi se provjerilo jesu li i ostale bjelančevine kompleksa ESCRT-0 vezane uz membranu ranih endosoma u živčanim stanicama, učinjeno je dvostruko imunocitokemijsko bojanje s biljegom ranih endosoma EEA1 (slika 6A) te drugom STAM izoformom, molekulom STAM1 i molekulom HRS. Imunofluorescentno bojanje pokazalo je kako su molekule STAM1 i HRS pozitivne na točkaste strukture koje boji EEA1, čime je potvrđeno da se i ostale bjelančevine kompleksa ESCRT-0 većinom nalaze vezane na rane endosome.

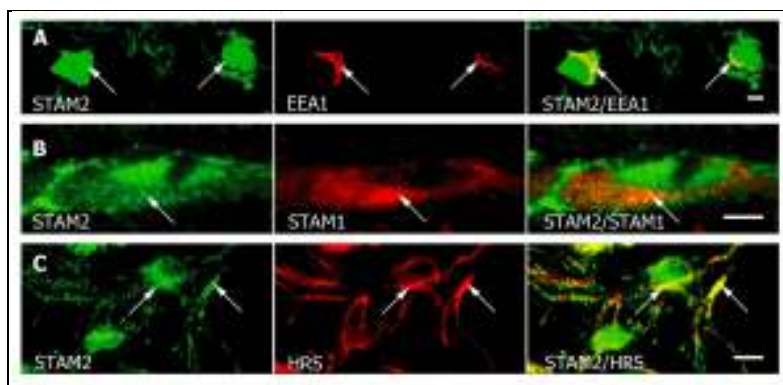
Kako bi se istražilo djeluje li uistinu bjelančevina STAM2 kao dio kompleksa ESCRT-0, učinjeno je dvostruko imunocitokemijsko bojanje na primarnim kulturama živčanih stanica kore velikog mozga. Kolokalizacijske studije pokazale su kako STAM2 i STAM1, te STAM2 i HRS međusobno kolokaliziraju u uvjetima *in vitro* (slike 6B, 6C).

Regionalna distribucija kompleksa ESCRT-0 pokazana je i u živčanim stanicama središnjeg i perifernog živčanog sustava. Tako je imunofluorescentno bojanje na koronarnim kriorezovima mozga, te intramuralnim ganglijima debelog crijeva, pokazalo kako bjelančevina STAM2 kolokalizira s bjelančevinama STAM1 i HRS (slika 7). Raspored bjelančevina STAM1 i HRS nešto je širi od rasporeda bjelančevine STAM2. Tako su, primjerice u probavnom sustavu, STAM1 i HRS prisutni u svim slojevima probavne cijevi, iako je njihovo bojanje bilo nešto jače u mijenteričkom i submukoznom pleksusu enteričkog živčanog sustava, u kojem je pokazana kolokalizacija s bjelančevinom STAM2.

Navedena istraživanja potvrdila su kako je bjelančevina STAM2 vezana uz rane endosome, kao dio kompleksa ESCRT-0 i u živčanom sustavu *in vivo*.



**Slika 6.** Izražaj *Stam2* i molekula koje međudjeluju sa STAM2 na primarnim kulturama živčanih stanica kore velikog mozga. (A) Kolokalizacija STAM2 i EEA1, biljega ranih endosoma, upućuje na smještaj STAM2 na membrani ranih endosoma. (B, C) Dvostruko imunocitokemijsko bojanje STAM2 i bjelančevina kompleksa ESCRT-0; HRS (B) i STAM1 (C). (D, E) Dvostruko imunocitokemijsko bojanje STAM2 i bjelančevina koje međudjeluju sa STAM2; AMSH (D) i UBPY (E). Strelice pokazuju mjesta kolokalizacije dviju bjelančevina. Crta mjerila - 10  $\mu$ m.



**Slika 7.** Izražaj *Stam2* u enteričkom živčanom sustavu. (A) STAM2 djelomično kolokalizira s protutijelom EEA1 (strelice), što ukazuje na smještaj STAM2 na membrani ranih endosoma. (B, C) Kolokalizacijske studije pokazale su kako STAM2 kolokalizira s ostalim članovima kompleksa ESCRT-0. Strelica pokazuje kolokalizaciju STAM2 i STAM1 (B), odnosno HRS (C) u mijenteričkom (B) i submukoznom (C) pleksusu debelog crijeva. Crte mjerila - 10  $\mu$ m.

### 5.1.3. Bjelančavina STAM2 smještena je u jezgri živčanih stanica

Imunocitokemijsko bojanje primarnih kultura živčanih stanica kore velikog mozga pokazalo je kako STAM2 ima točkasti raspored po citoplazmi. Točkasti signal djelomično kolokalizira s biljgom ranih endosoma, što upućuje na činjenicu da je STAM2 lokaliziran na endosomima, ali i unutar citoplazme stanice. Ovi su rezultati u skladu s već otprije poznatim rezultatima razmještaja bjelančevine STAM2 na različitim modelima *in vitro*. Međutim, vrlo neočekivano, jak i homogen signal STAM2 pronađen je u jezgri živčane stanice, kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uvjetima; u jezgrama živčanih stanica mozga, te intramuralnih ganglija. Dodatna specifičnost imunocitokemijskog i imunohistokemijskog bojanja potvrđena je s tri različita komercijalno dostupna protutijela STAM2 (tvrtke Abcam, Bioworld Technology i Santa Cruz Biotechnology). Sva tri protutijela pokazala su vrlo sličan signal razmještaja bjelančevine STAM2 unutar stanice, difuzno u citoplazmi u obliku točkastog signala, uz izrazito jak signal u jezgri (slika 5). Potvrda da se doista radi o jezgrama živčanih stanica dobila se imunobojanjem protutijelom NeuN (engl. *neuronal nuclei*; jezgre neurona), specifičnim protutijelom koje boji jezgre, isključivo živčanih stanica.

Kako bi dobili konačnu potvrdu unutarstanične lokalizacije bjelančevine STAM2, učinjen je pokus substanične frakcionacije. Substanična frakcionacija je metoda izdvajanja pojedinih staničnih organela ili manjih odjeljaka iz suspenzije stanica u zasebne frakcije. Ovom je

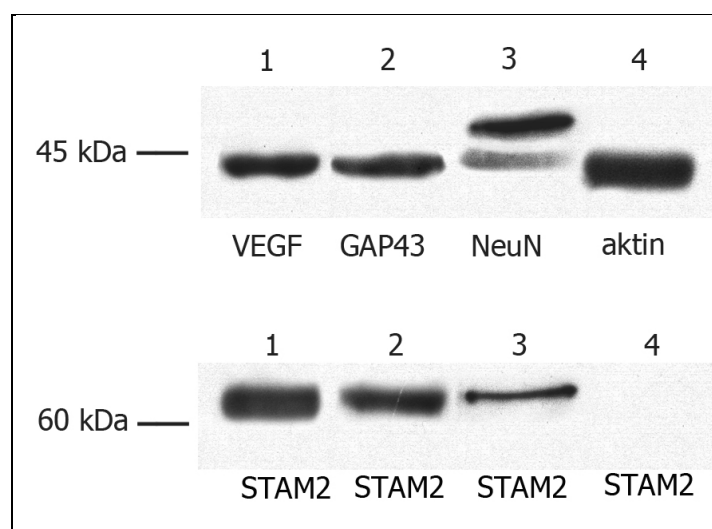
metodom stanice potrebno razoriti, držeći ih u sredini koja oponaša uvjete u samoj stanici. Organeli pritom moraju ostati intaktni budući da njihova aktivnost mora biti očuvana. Potrebno je naglasiti kako su proteomske analize primarnih kultura živčanih stanica vrlo zahtjevne zbog morfoloških i fizioloških karakteristika živčanih stanica. U ovom radu korištena je modificirana metoda Bernocco i suradnika (85) koja se temelji na otopinama za izolaciju koje sadrže deterdžente, čime se omogućuje izdvajanje frakcija na relativno malom broju stanica (oko  $3,6 \times 10^7$  živčanih stanica). Uzastopnim diferencijalnim centrifugiranjem staničnog homogenata u otopinama različitog sastava dobiva se niz frakcija s djelomično purificiranim organelama. Pojedine frakcije pritom se razlikuju po masi i gustoći.

Sastav pojedinih frakcija provjerio se protutijelima bjelančevina za koje je poznato da se nalaze u točno određenim staničnim odjeljcima. Kao biljezi pojedinih frakcija korištena su redom sljedeća protutijela: protutijelo VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*; vaskularni endotelni čimbenik rasta) za frakciju citosola, protutijelo GAP-43 (engl. *growth associated protein 43*; bjelančevina povezana rastom 43) kao biljeg frakcije organela i membrana, protutijelo NeuN kao biljeg jezgara, dok je protutijelo aktin korišten kao jedan od najčešćih biljega frakcije citoskeleta. Nakon spektrofotometrijskog određivanja koncentracije bjelančevina metodom po Bradfordu, jednaka količina bjelančevina pojedinih frakcija (50  $\mu$ g) propuštena je kroz poliakrilamidni gel. Nakon razdvajanja bjelančevina elektroforezom i prijenosa na membranu, bjelančevine su imunobojeane pojedinim primarnim i odgovarajućim sekundarnim protutijelima. Nakon detekcije signala, bilo je vidljivo da se u frakciji citosola nalazi bjelančevina mase 43 kDa, što je očekivana masa bjelančevine VEGF; u frakciji organela i membrana bio je vidljiv nalaz bjelančevine mase 43 kDa, što odgovara masi bjelančevine GAP-43; u frakciji jezgri bio je vidljiv nalaz bjelančevine mase 46 kDa, što je očekivana masa normalne bjelančevine NeuN; dok je u frakciji citosola bio vidljiv nalaz bjelančevine mase 43 kDa, što odgovara masi bjelančevine aktin. Iz ovog se pokusa može zaključiti da je metoda izdvajanja pojedinih staničnih odjeljaka bila uspješna, te da se dobivene bjelančevine mogu koristiti za daljnje analize utvrđivanja prisutnosti bjelančevine STAM2 u pojedinim staničnim frakcijama.

Kako bi se provjerilo postoji li bjelančevina STAM2 u frakciji jezgri živčanih stanica ponovno je primijenjen postupak imunobojanja bjelančevina na membrani. U navedenom je postupku na bjelančevine dobivene postupkom substancične frakcionacije primijenjeno



protutijelo specifično za bjelančevinu STAM2. Iz rezultata postupka vidljivo je kako je bjelančevina STAM2 najviše zastupljena u frakciji citosola i u frakciji membrana i organela. Međutim značajna količina bjelančevine STAM2 nalazi se i u frakciji jezgri. U navedenim frakcijama vidljiv je nalaz bjelančevine mase nešto veće od 58 kDa, što je očekivana masa ubikvitinirane bjelančevine STAM2. U frakciji citoskeleta imunobojanjem membrane nije pronađena bjelančevina STAM2 (slika 8). Navedeni pokusi pokazali su po prvi puta kako je bjelančevina STAM2 prisutna i u jezgri živčane stanice.

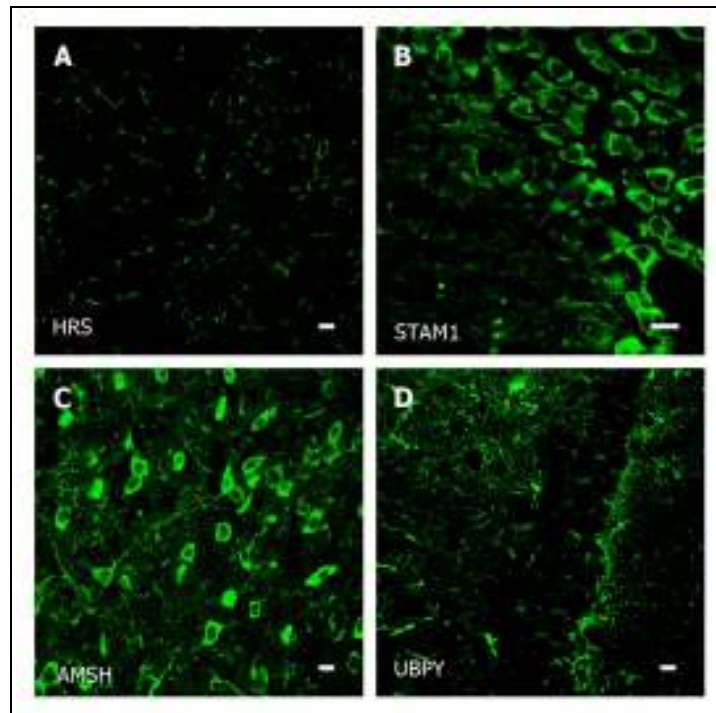


**Slika 8.** Imunobojanje bjelančevina dobivenih substaničnom frakcionacijom postupkom „westren blot“. 1- frakcija citosola; 2 - frakcija membrana i organela; 3 - frakcija jezgri; 4 - frakcija citoskeleta. Masa bjelančevina VEGF, GAP-43 i aktin je 43 kDa. Protutijelo NeuN ostavlja na membrani 2 vrpce, mase 46 - 48 kDa. Očekivana masa ubikvitiniranog oblika STAM2 protutijela nešto je veća od 58 kDa.

#### **5.1.4. Bjelančevine koje međudjeluju s bjelančevinom STAM2 nisu lokalizirane u jezgri**

Kako bi se provjerilo jesu li bjelančevine koje se vežu na molekulu STAM2, a to su redom molekule STAM1, HRS, AMSH i UBPY, smještene u jezgri, učinjene su imunohistokemijske analize na živčanim stanicama mozga. Imunobojanje je pokazalo kako bjelančevine STAM1, HRS i UBPY nisu smještene u jezgri živčane stanice. Nešto različit signal pokazala je bjelančevina AMSH. Naime, pokazalo se kako njezin unutarstanični raspored ovisi o

regionalnoj distribuciji. Tako je primjerice u području hipokampusa, bjelančevina AMSH prisutna u citoplazmi nastavaka živčanih stanica, dok u području kore velikog mozga, bjelančevina AMSH ima točkasti signal koji okružuje jezgrinu membranu.



**Slika 9.** Imunohistokemijsko bojanje bjelančevina koje međudjeluju s bjelančevinom STAM2; (A) HRS, (B) STAM1, (C) AMSH i (D) UBPY. Imunobojanje ne pokazuje signal u jezgri. Crta mjerila - 10  $\mu$ m.

Ovaj je pokus pokazao kako se ostale bjelančevine kompleksa ESCRT-0, STAM1 i HRS ne nalaze normalno u jezgri živčane stanice, kao ni bjelančevina UBPY, koja se veže na domenu SH3 molekule STAM2. Međutim molekula AMSH, druga molekula koja se veže na domenu SH3 molekule STAM2, prisutna je na jezgrinoj membrani, ali ne i u samoj jezgri.

## 5.2. STAM2 u središnjem živčanom sustavu

### 5.2.1. Gen *Stam2* izražen je u središnjem živčanom sustavu

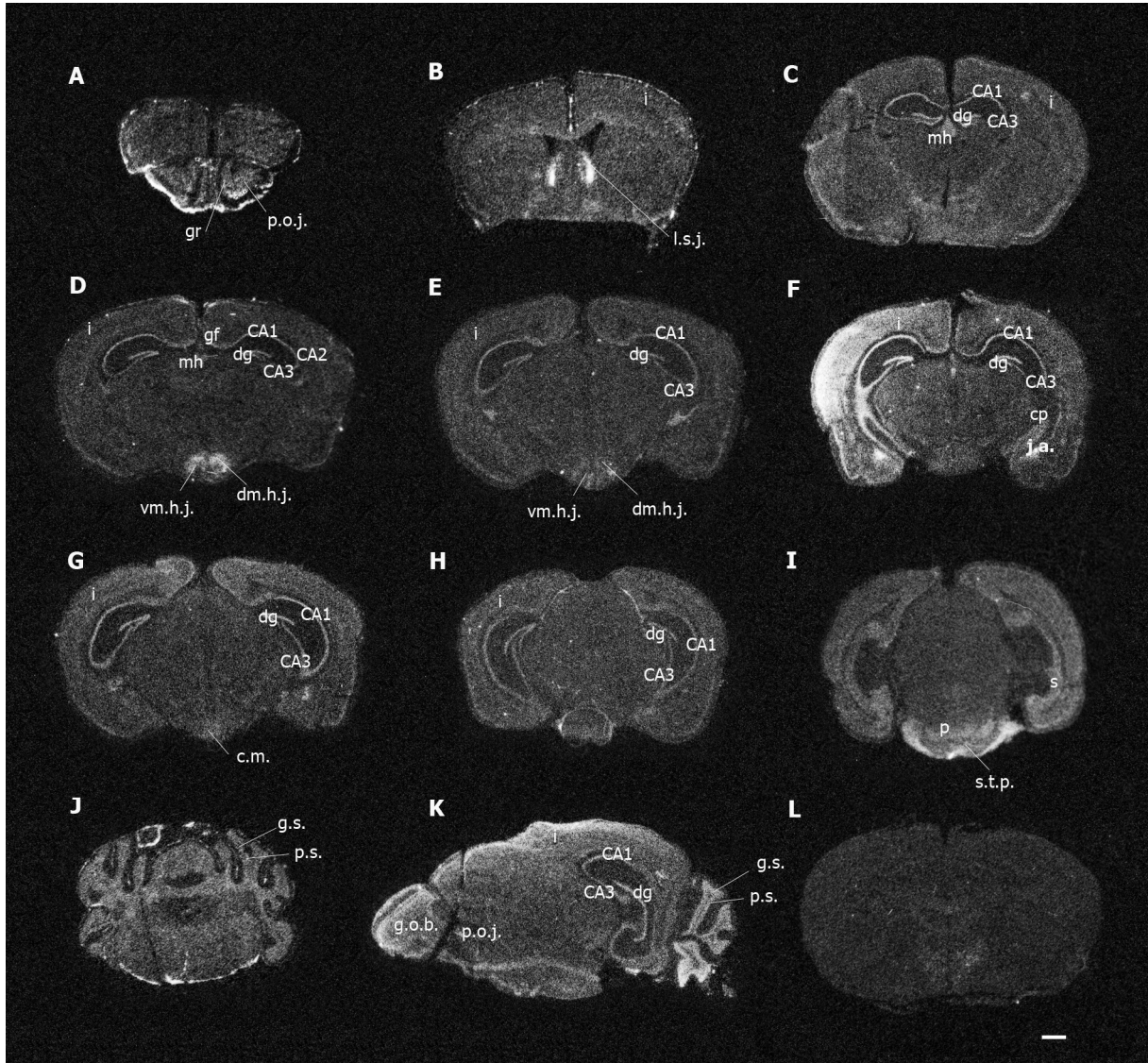
Izražaj gena *Stam2* određen je pomoću lokalizacije transkripta mRNA za gen *Stam2* u mozgu odraslog miša postupkom hibridizacije RNA *in situ*. U metodi se koriste fragmenti DNA dugački 45 parova baza obilježeni sumporovim izotopom ( $^{35}\text{S}$ -dATP), koji se pod strogo kontroliranim uvjetima optimalne temperature i pH spajaju, odnosno hibridiziraju s ciljnom sekvencom u tkivu. Takvi oligonukleotidi su fragmenti sekvence DNA komplementarne mRNA gena *Stam2* koji se detektirao u stanici. Spomenutim procesom nastao je obilježen hibrid DNA-RNA koji je vizualiziran u histološkom uzorku tkiva.

Specifičnost detekcije mRNA dobivene hibridizacijom RNA *in situ* potvrđena je odsutnošću hibridizacijskog signala u uzorcima tkiva inkubiranim sa *Stam2* „sense“ sandom (slika 10L), koja je zapravo identična sekvenci mRNA gena *Stam2*, u odnosu na signal dobiven „antisense“ sandom koja je komplementarna sekvenci mRNA gena *Stam2*.

Pokazano je kako je transkript mRNA gena *Stam2* rasprostranjen u različitim regijama mozga (slika 10, 11).

U telencefalonu najjači izražaj gena *Stam2* vidljiv je u području II i III sloja izokorteksa (*lamina granularis externa* i *lamina pyramidalis externa*), nešto slabiji izražaj transkripta gena *Stam2* vidljiv je u V i VI sloju izokorteksa (*lamina pyramidalis interna* i *lamina multiformis*), dok je u IV sloju (*lamina granularis interna*) izražaj vrlo slab. U I sloju (*lamina molecularis*) izražaj gena nije uočljiv. Signal transkripta gena *Stam2* kroz slojeve izokorteksa konstantan je u svim dijelovima izokorteksa. Nadalje, vrlo jak izražaj gena *Stam2* vidljiv je u području hipokampusa. Najintenzivniji je izražaj u sloju znatih stanica dentatnog girusa, te u piramidnom sloju područja amonovog roga (*cornu ammonis*) CA1 i CA2, dok je u piramidnom sloju područja CA3 izražaj nešto slabiji. Snažan signal je također vidljiv u području *gyrus fasciolaris*, dok je nešto slabiji u subikulumu. U području amigdale slab je signal vidljiv u lateralnim, bazolateralnim, bazomedijalnim, te u posteriornim jezgrama amigdale. Izražaj gena *Stam2* vidljiv je i u području olfaktornih bulbusa. Jak signal transkripta mRNA primjećen je u glomerularnom sloju glavnog olfaktornog bulbusa, te u prednjoj olfaktornoj jezgri. Nešto slabiji signal transkripta vidljiv je u granularnom sloju glavnog

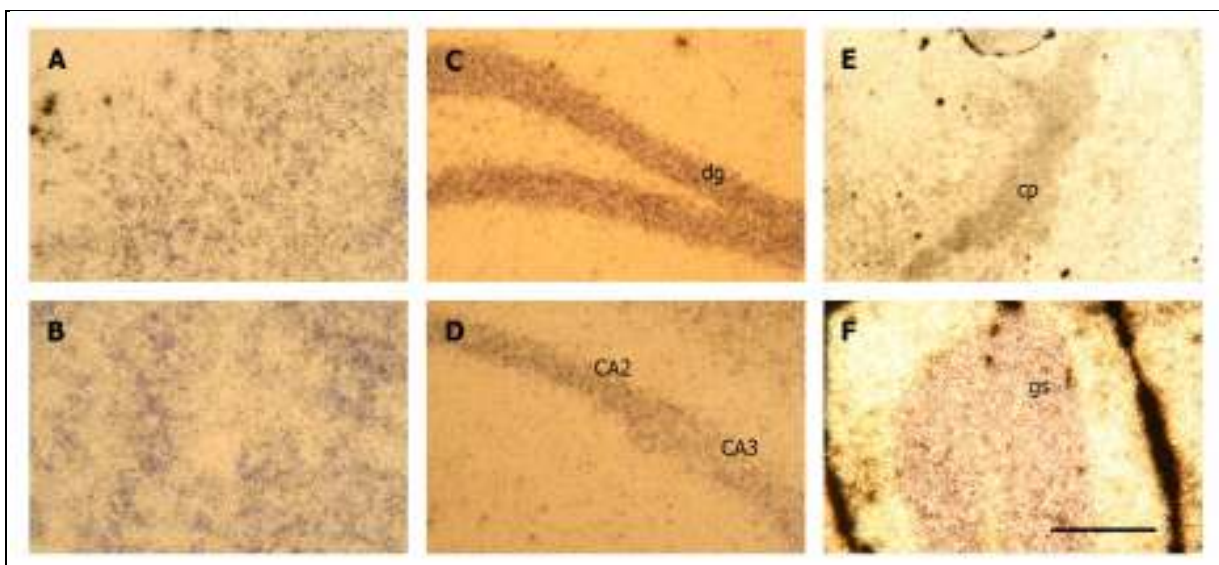
olfaktornog bulbosa, dok je u sloju mitralnih stanica signal vrlo slab. Vrlo slab hibridizacijski signal uočen je i u *stratum plexiformes internum*, dok signal izostaje u *stratum plexiformes externum*. Vrlo slab izražaj gena *Stam2* vidljiv je i u području striatuma, i to redom u područjima caudoputamena, lateralnih septalnih jezgri, te u *nucleus accumbens* (tablica 5).



**Slika 10.** Izražaj gena *Stam2* u mozgu odraslog miša. (A - K) Serijski koronarni kriorezovi odraslog mozga miša divljeg tipa koji posjeduje normalan gen *Stam2*. (L) Koronarni kriorez mozga miša divljeg tipa tretiran „sense“ sondom, koja predstavlja negativnu kontrolu. **p.o.j.** - prednja olfaktorna jezgra, **gr** - granularni sloj olfaktornog bulbosa, **g.o.b.** - glavni olfaktorni bulbus, **l.s.j.** - lateralne septalne jezgre, **vm.h.j.** - ventromedijalna hipotalamička jezgra, **dm.h.j.** - dorzomedijalna hipotalamička jezgra, **mh** - medijalna habenula, **i** - izokorteks, **CA1,CA2,CA3** - *cornu ammonis*, **dg** - dentatni girus, **gf** - *gyrus fasciolaris*, **s** - subikulum, **j.a.** - jezgre amigdale, **cp** - caudoputamen, **cm** - *corpus mamillare*, **p** - pons, **s.t.p.** - siva tvar ponsa, **p.s.** - sloj Purkinjeovih stanica, **g.s.** - granularni sloj malog mozga. Crta mjerila - 1 mm.

U području diencefalona vrlo je jak signal uočljiv u medijalnoj habenuli epitalamusa. U području hipotalamusa vrlo je jak izražaj gena vidljiv u ventromedijalnoj i dorzomedijalnoj hipotalamičkoj jezgri, dok je nešto slabiji izražaj u *corpus mamillare*. U talamusu nije primijećen jači izražaj gena *Stam2* (tablica 5).

U području metencefalona vidljiv je signal u malom mozgu, te u ponsu. U malom mozgu vrlo jak signal ograničen je na granularni sloj. U sloju Purkinjeovih stanica signal je nešto slabiji, dok u molekularnom sloju nije uočen. U području ponsa signal je vrlo slab (tablica 5).



**Slika 11.** Bojanje po Nisslu na staklima tretiranim fotografskom emulzijom nakon hibridizacije RNA *in situ*. Crne točke predstavljaju precipitat srebra koji se veže na sumporom vezanu sondu *Stam2*. Ljubičasto obojenje predstavlja bojanje po Nisslu. (A) glomerularni sloj olfaktornog bulbusa, (B) granularni sloj olfaktornog bulbusa, (C) dentatni girus; **dg**, (D) prijelaz iz CA2 u CA3 regiju hipokampusa, (E) caudoputamen; **cp**, (F) mali mozak; **gs** - granularni sloj. Crta mjerila - 1 mm.

### 5.2.2. Stopljena bjelančevina STAM2- $\beta$ -galaktozidaza prisutna je u središnjem živčanom sustavu

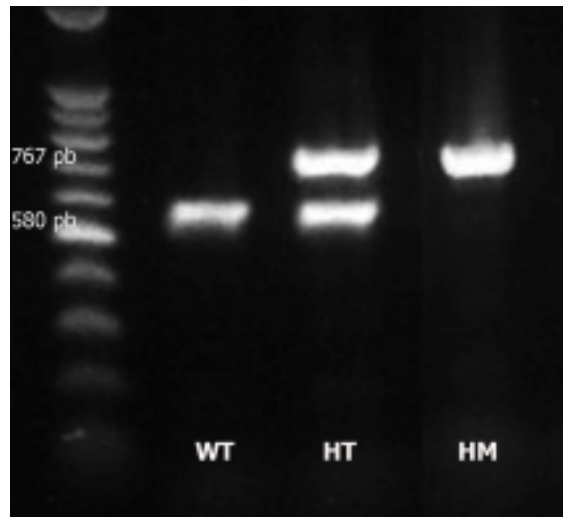
Nakon određivanja izražaja gena *Stam2* na razini njegove glasničke RNA, bilo je potrebno provjeriti odgovara li uzorak izražaja gena *lacZ* u miševima *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* izražaju gena *Stam2*. Budući da vektor genske zamke u liniji *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* sadrži gen biljeg *lacZ*, koji je zbog

nedostatka vlastitog promotora, pod utjecajem promotora gena *Stam2*, što znači da je aktivan kada je aktivan i sam gen, moguće je praćenje aktivnosti gena *lacZ* upotrijebiti za analizu uzorka izražaja gena *Stam2* uhvaćenog postupkom genske zamke. Gen *lacZ* kodira za enzim  $\beta$ -galaktozidazu, koja cijepa laktozu na monosaharide glukozu i galaktozu. Derivat laktoze, X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopranozid), koristi se kao boja koja ukazuje izražava li stanica  $\beta$ -galaktozidazu, budući da svojom aktivnošću stvara plavi precipitat, koji samo tkivo u kojem postoji izražaj gena *lacZ* boji plavo (slika 12).



**Slika 12.** Morfologija i gustoća X-gal bojanja kao pokazatelja aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze, jednake su u homozigotnih i heterozigotnih životinja. Koronarni rezovi odraslog mozga. Heterozigotni (**B**, *Stam2*<sup>+/Gt1Gaj</sup>) nosioci mutacije pokazuju nešto manji intenzitet X-gal bojanja, budući da posjeduju samo jedan mutirani alel s ugrađenim vektorom genske zamke koji sadrži transgen *lacZ*, u odnosu na homozigotne (**A**, *Stam2*<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>) nosioce koji posjeduju oba takva alela. Životine divljeg tipa (**C**, *Stam2*<sup>+/+</sup>) ne posjeduju navedeni alel, stoga je plavi precipitat X-gal bojanja odsutan. Crta mjerila - 1 mm.

Budući da se homozigotni i heterozigotni nosioci preinake transgenične mišje linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup> morfološki ne razlikuju od miševa divljeg tipa, genotip mišje linije određuje se lančanom reakcijom polimerazom pomoću DNA izolirane iz mišjeg repa. Genotipizacija se temelji na utvrđenoj činjenici kako homozigotni miševi posjeduju uvećani alel *Stam2* u odnosu na normalan alel miševa divljeg tipa, kao posljedicu ugradnje vektora genske zamke u taj gen. Heterozigotni nosioci mutacije posjeduju različite alele (slika 13).



**Slika 13.** Genotipizacija zametaka učinjena metodom lančane reakcije polimerazom. Homozigotni miševi (**HM**) posjeduju uvećani alel (prikazan vrpcom veličine 767 pb) *Stam2* u odnosu na normalan alel (prikazan vrpcom veličine 580 pb) miševa divljeg tipa (**WT**), kao posljedicu ugradnje vektora genske zamke u taj gen. Heterozigotni nosioci mutacije (**HT**) posjeduju oba alela.

U skladu s rezultatima dobivenim hibridizacijom RNA *in situ*, histokemijsko bojanje  $\beta$ -galaktozidaze na homozigotnim nosiocima preinake pokazalo je jednaku raspodjelu gena *Stam2* u različitim regijama mozga (slika 14). U nekim se regijama mozga razlikuje intenzitet prisutnosti izražaja gena *Stam2* i aktivnosti stopljene bjelančevine STAM2- $\beta$ -galaktozidaza (tablica 5). Specifičnost signala X-gal bojanja potvrđeno je odsutnošću signala u uzorcima tkiva divljeg tipa, budući da  $\beta$ -galaktozidaza nije normalno prisutna u sisavaca (slika 12C, 14L).

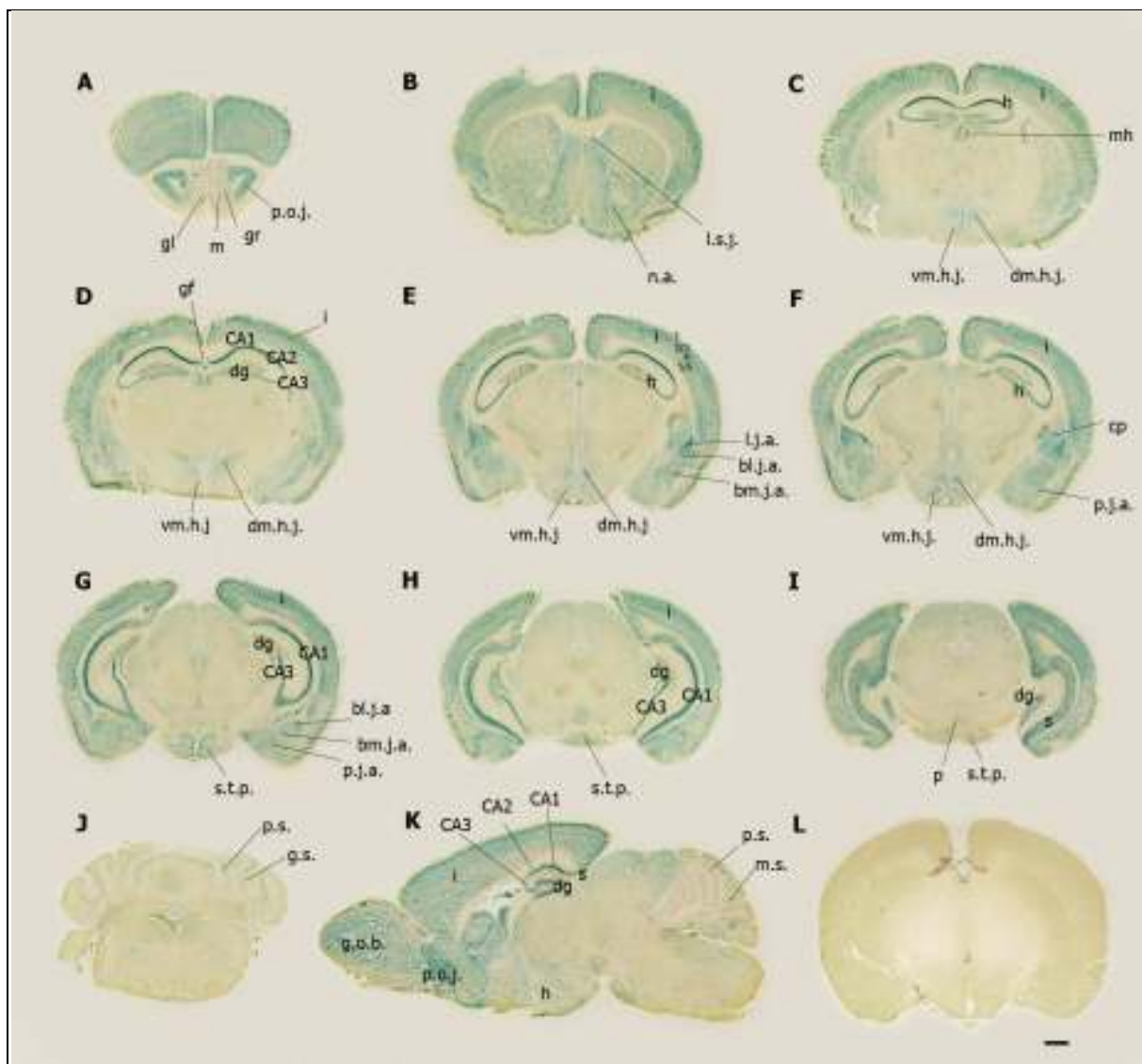
Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze u izokorteksu jednaka je izražaju transkripta gena *Stam2*. Najjači signal vidljiv je u II i III sloju, nešto je slabiji u V i VI sloju, dok je u IV sloju izokorteksa izražaj vrlo slab. U I sloju izokorteksa aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze nije uočena. U području hipokampusa najintenzivniji je signal  $\beta$ -galaktozidaze u piramidnom sloju područja amonovog roga CA1 i CA2, dok je u piramidnom sloju područja CA3 izražaj nešto slabiji, slično kao i kod transkripta mRNA gena *Stam2*. Snažan signal također je vidljiv u području *gyrus fasciolaris*, dok je nešto slabiji u subikulumu. U sloju zrnatih stanica dentatnog girusa X-gal bojanje pokazalo je nešto slabiji signal nego što je to vidljivo kod hibridizacije RNA *in situ*. U području amigdale slabu  $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost pokazuju lateralne, bazolateralne,

bazomedijalne te posteriorne jezgre amigdale. U olfaktornim bulbusima X-gal bojanje konzistentno je signalu transkripta mRNA *Stam2*. Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze intenzivna je u glomerularnom sloju glavnog olfaktornog bulbusa te u prednjoj olfaktornoj jezgri, dok je nešto manje intenzivna aktivnost u granularnom sloju. Vrlo slaba aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze zabilježena je u sloju mitralnih stanica i u *stratum plexiformes internum* (tablica 5).

Vrlo je slabo bojanje vidljivo i u striatumu, u području lateralnih septalnih jezgri, te u *nucleus accumbens*, dok je u caudoputamenu nešto jače. U epitalamusu, u području medijalne habenule, signal X-gal bojanja je vrlo jak. U području hipotalamusa aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze nešto je niža nego što je to signal transkripta mRNA gena *Stam2*. Nešto je slabiji izražaj u ventromedijalnoj i dorzomedijalnoj hipotalamičkoj jezgri, dok je vrlo slaba aktivnost u *corpus mamillare*. U području talamusa također nije primijećena jača aktivnost. U ponsu metencefalona signal dobiven X-gal bojanjem je jednako slab kao i onaj dobiven hibridizacijom RNA *in situ*. U području malog mozga vrlo jaka aktivnost vidljiva je u granularnom sloju. U sloju Purkinjeovih stanica signal je nešto slabiji, dok u molekularnom sloju nije uočen (tablica 5).

$\beta$ -galaktozidazna aktivnost prisutna je također u sivoj tvari leđne moždine (slika 18D).





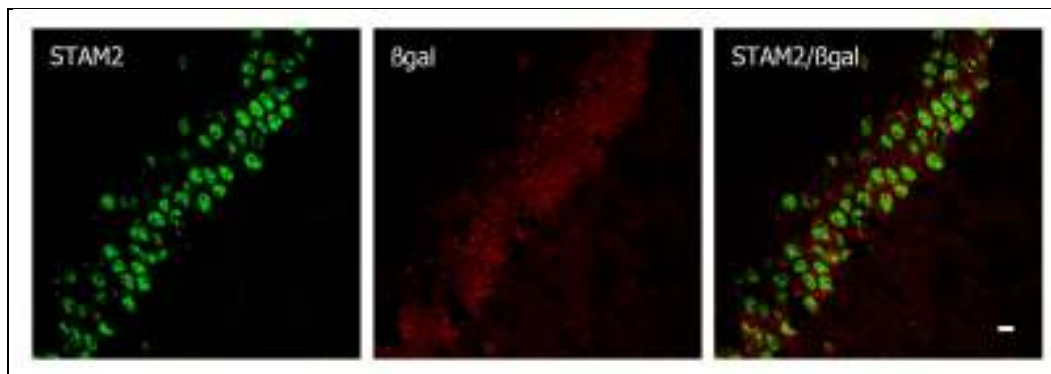
**Slika 14.**  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost kao biljeg izražaja *Stam2*. (A - K) Serijski koronarni kriorezovi odraslog mozga *Stam2*<sup>GtlGaj/GtlGaj</sup> miša. (L) Koronarni kriorez mozga miša divljeg tipa (*Stam2*<sup>+/+</sup>) koji predstavlja negativnu kontrolu. **p.o.j.** - prednja olfaktorna jezgra, **gl** - glomerularni sloj olfaktornog bulbusa, **gr** - granularni sloj olfaktornog bulbusa, **m** - sloj mitralnih stanica olfaktornog bulbusa, **g.o.b.** - glavni olfaktorni bulbus, **l.s.j.** - lateralne septalne jezgre, **n.a.** - *nucleus accumbens*, **vm.h.j.** - ventromedijalna hipotalamička jezgra, **dm.h.j.** - dorzomedijalna hipotalamička jezgra, **mh** - medijalna habenula, **i** - izokorteks, **CA1,CA2,CA3** - *cornu ammonis*, **dg** - dentatni girus, **gf** - *gyrus fasciolaris*, **s** - subikulum, **l.j.a.** - lateralne jezgre amigdale, **bl.j.a.** - bazolateralne jezgre amigdale, **bm.j.a.** - bazomedijalne jezgre amigdale, **p.j.a.** - posteriorne jezgre amigdale, **cp** - caudoputamen, **p** - pons, **s.t.p.** - siva tvar ponsa, **p.s.** - sloj Purkinjeovih stanica, **g.s.** - granularni sloj malog mozga. Crta mjerila - 1 mm.

**Tablica 5.** Izražaj gena *Stam2* u mozgu miša određen hibridizacijom RNA *in situ* (ISH) i X-gal bojanjem. “-“ - nema signala, “+“ - slab signal, “++“ - jak signal, “+++“ - vrlo jak signal.

<b>REGIJA MOZGA</b>	<b>ISH</b>	<b>X-gal</b>
<b>TELENCEPHALON</b>		
Izokorteks		
II/III sloj	+++	+++
IV sloj	+	+
V/VI sloj	++	++
Hipokampus		
Piramidni sloj CA1	+++	+++
Piramidni sloj CA2	+++	+++
Piramidni sloj CA3	++	++
Sloj zrnatih stanica (dentatni girus)	+++	++
Subikulum	++	++
Fasciola cinerea ( <i>gyrus fasciolaris</i> )	+++	+++
Amigdala		
Lateralne jezgre amigdale	+	+
Bazolateralne jezgre amigdale	+	+
Bazomedijalne jezgre amigdale	+	+
Posteriorne jezgre amigdale	+	+
Olfaktorni bulbus		
Glavni olfaktorni bulbus, granularni sloj	++	++
Glavni olfaktorni bulbus, glomerularni sloj	+++	+++
Glavni olfaktorni bulbus, <i>stratum plexiformes internum</i>	+	+
Glavni olfaktorni bulbus, <i>stratum plexiformes externum</i>	-	-
Glavni olfaktorni bulbus, sloj mitralnih stanica	+	+
Prednja olfaktorna jezgra	+++	+++
Sporadni olfaktorni bulbus	+	+
Striatum		
Caudoputamen	++	++
Lateralne septalne jezgre	+	+
<i>Nucleus accumbens</i>	+	+
<b>DIENCEFALON</b>		
Epitalamus		
Medijalna habenula	+++	+++
Hipotalamus		
Ventromedijalna hipotalamička jezgra	+++	++
Dorzomedijalna hipotalamička jezgra	+++	++
<i>Corpus mamillare</i>	++	+
<b>METENCEPHALON</b>		
Mali mozak		
Molekularni sloj	-	-
Sloj Purkinjeovih stanica	+	+
Granularni sloj	+++	+++
Pons		
Siva tvar ponsa (Pontine gray)	+	+
Jezgre ponsa	+	+

### 5.2.3. Bjelančevina $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg STAM2 prisutna je u STAM2-pozitivnim stanicama središnjeg živčanog sustava

Kako bi provjerili odgovara li zaista uzorak izražaja transgena *lacZ* endogenom izražaju gena *Stam2*, na kriorezovima heterozigotnog (*Stam2*<sup>+/*Gt1Gaj*</sup>) mozga učinjeno je dvostruko imunohistokemijsko bojanje s protutijelima specifičnim za bjelančevine STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza. Uočeno preklapanje u raspodjeli bjelančevine STAM2 i bjelančevine  $\beta$ -galaktozidaza ukazuje na činjenicu da X-gal bojanje vjerno prikazuje izražaj gena *Stam2* (slika 15).



**Slika 15.** Kolokalizacija bjelančevina STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza u hipokampusu heterozigotnog miša (*Stam2*<sup>+/*Gt1Gaj*</sup>). Uočeno preklapanje u razmještaju bjelančevina STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza potvrđuje kako izražaj gena *lacZ* na miševima preinačenim postupkom genske zamke vjerno prikazuje izražaj *Stam2*. Crta mjerila - 10  $\mu$ m.

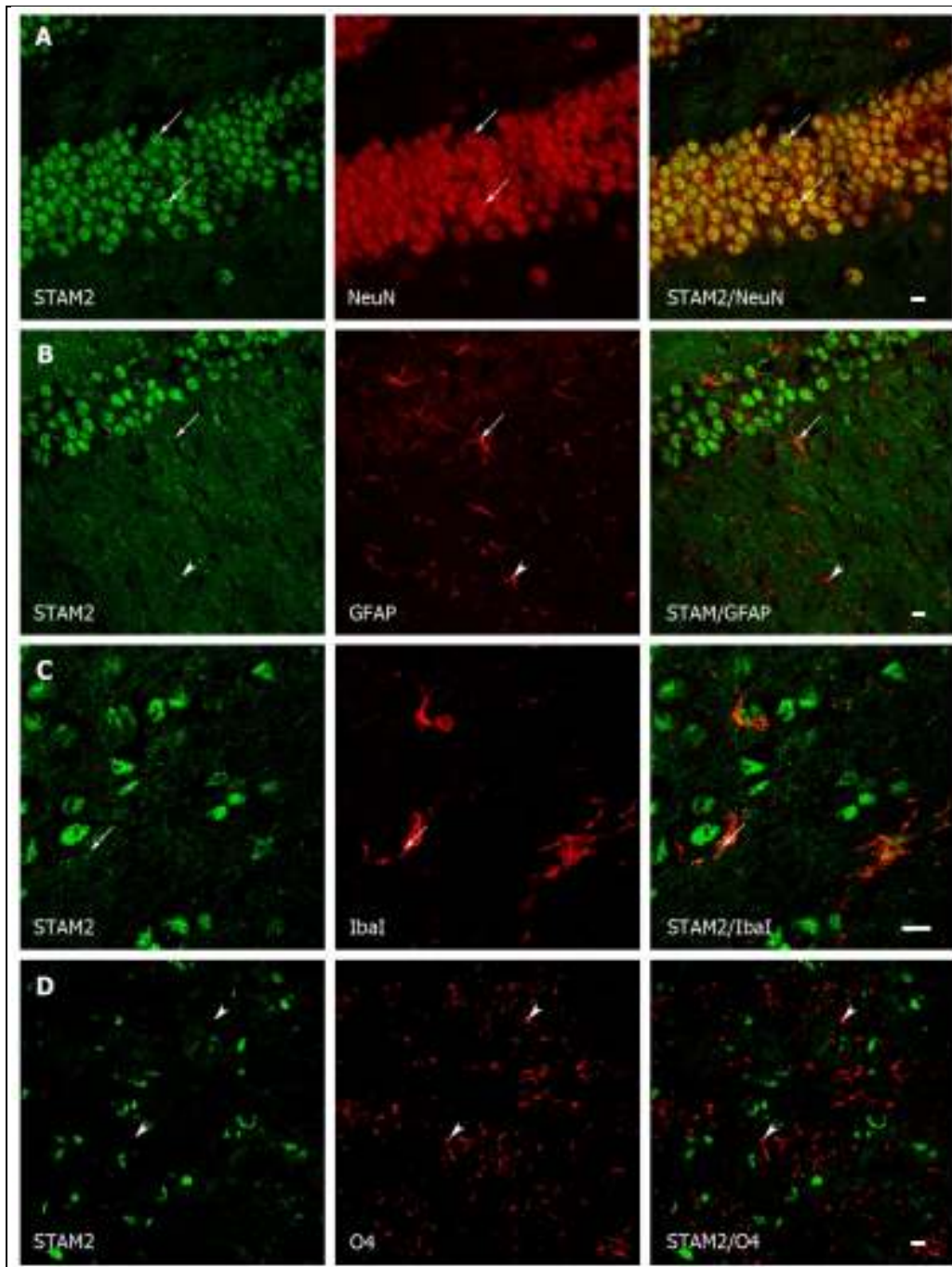
Kolokalizacijske imunohistokemijske studije pokazale su kako su bjelančevine STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza prisutne u heterozigotnih miševa u istim regijama mozga, te u istim stanicama, međutim unutarstanična raspodjela ovih bjelančevina je različita. STAM2 je prisutan u tijelu stanica i u nastavcima, s vrlo jakim, točkastim, fluorescentnim signalom vidljivim unutar citoplazme, kao i unutar jezgri nekih stanica. Protutijelo na  $\beta$ -galaktozidazu daje homogen signal unutar citoplazme, dok unutar jezgre, signal nije vidljiv. Razlog različite unutarstanične raspodjele stopljene bjelančevine STAM2- $\beta$ -galaktozidaza u odnosu na normalnu bjelančevinu STAM2 jest moguća nestabilnost mutirane bjelančevine, kojoj nedostaju ključne

funkcionalne domene koje određuju smještaj bjelančevine u stanici, stoga je ovakav mutirani oblik bjelančevine nesposoban doputovati do mjesta djelovanja unutar stanice.

#### **5.2.4. Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama središnjeg živčanog sustava**

Za određivanje prisutnosti bjelančevine STAM2 u pojedinim stanicama središnjeg živčanog sustava upotrijebljeni su koronarni kriorezovi mozga odraslih miševa linije C57Bl/6NCrl koji nisu nosioci mutacije, te posjeduju aktivnu bjelančevinu STAM2. Lokalizacija bjelančevine STAM2 analizirala se uz pomoć specifičnog anti-STAM2 protutijela, te niza protutijela koja se koriste kao biljezi različitih staničnih tipova. Kao biljezi živčanih stanica koristila su se protutijela MAP2 (engl. *microtubule-associated protein 2*; bjelančevina povezana s mikrotubulima 2) i NeuN. MAP2 je bjelančevina specifična za citoskelet živčanih stanica, a nalazi se posebice u nastavcima živčanih stanica, dok je bjelančevina NeuN specifična za jezgre živčanih stanica. Kao biljezi glija stanica koristila su se protutijela: GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*; kisela glijalna fibrilarna bjelančevina), bjelančevina intemedijarnog filameta koja je izražena u astrocitima i nekim podvrstama ependimskih stanica središnjeg živčanog sustava, zatim IBA1 (engl. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*; molekula prilagođivač koja veže ionizirani kalcij 1), bjelančevina koja je specifično izražena u mikrogliji, te O4 (engl. *oligodendrocyte marker O4*; oligodendrocitni biljeg O4), bjelančevina koja se nalazi na površini tijela i nastavaka oligodendrocita.

Većina *Stam2*-pozitivnih stanica kolokalizira s biljezima živčanih stanica MAP2 i NeuN, što upućuje na činjenicu da su stanice koje izražavaju *Stam2*, većinom živčane stanice. Glija stanice, vizualizirane protutijelima GFAP i IBA1, kao biljezima astrocita i mikroglije, pokazale su slabo imunobojanje za bjelančevinu STAM2, dok je protutijelo O4, kao biljeg oligodendrocita, pokazalo vrlo slabo imunobojanje za bjelančevinu STAM2 (slika 16).



**Slika 16.** Izražaj *Stam2* u različitim stanicama središnjeg živčanog sustava. **(A)** Većina *Stam2*-pozitivnih stanica kolokalizira s bijelom živčanih stanica NeuN. **(B, C)** Glija stanice vizualizirane protutijelima GFAP i IBA1, kao biljezima astocita i mikroglije pokazale su slabo imunobojanje za STAM2. **(D)** Izražaj *Stam2* u oligodendrocitima, koji su vizualizirani protutijelom O4, vrlo je slab i usporediv s ubikvitarnim izražajem koje posjeduju gotovo sve stanice. Crta mjerila - 10  $\mu$ m.

### 5.3. STAM2 u perifernom živčanom sustavu

#### 5.3.1. Bjelančevina STAM2 prisutna je u perifernom živčanom sustavu

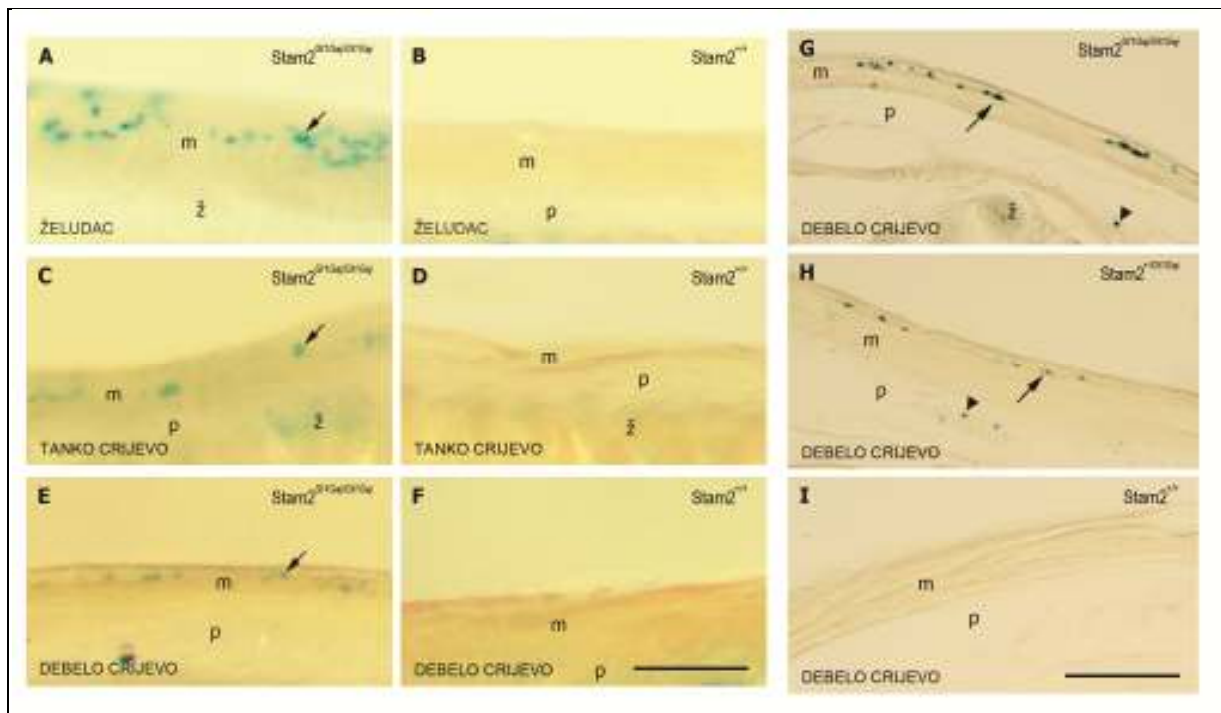
Kako bi se istražila prisutnost bjelančevine STAM2 u perifernom živčanom sustavu upotrijebljen je postupak imunohistokemije. Imunobojanjem kriorezova enteričkog živčanog sustava, protutijelom specifičnim za bjelančevinu STAM2, analizirane su životinje divljeg tipa. Bjelančevina STAM2 prisutna je u mijenteričkom pleksusu (*plexus myentericus Auerbachi*) i submukoznom pleksusu (*plexus submucosus Meissneri*) cijelom duljinom probavne cijevi. Samo u jednjaku, gdje submukozni pleksus nedostaje kod miša, imunobojanje je ograničeno samo na mijenterički pleksus. Nadalje, vrlo slab signal STAM2 prostire se duž cijele probavne cijevi, što ukazuje na činjenicu da je vrlo niska razina STAM2 prisutna u svim tkivima (epitelnom, vezivnom i mišićnom tkivu), što je u skladu s već objavljenim rezultatima “northern blot” analize (hibridizacije RNA) i RT-PCR (engl. *reverse transcription-polymerase chain reaction*; reverzna transkripcija-lančana reakcija polimerazom) (29, 79).

Ovim imunobojanjem pokazano je kako je bjelančevina STAM2 prisutna u enteričkom živčanom sustavu.

#### 5.3.2. Stopljena bjelančevina STAM2-β-galaktozidaza prisutna je u perifernom živčanom sustavu

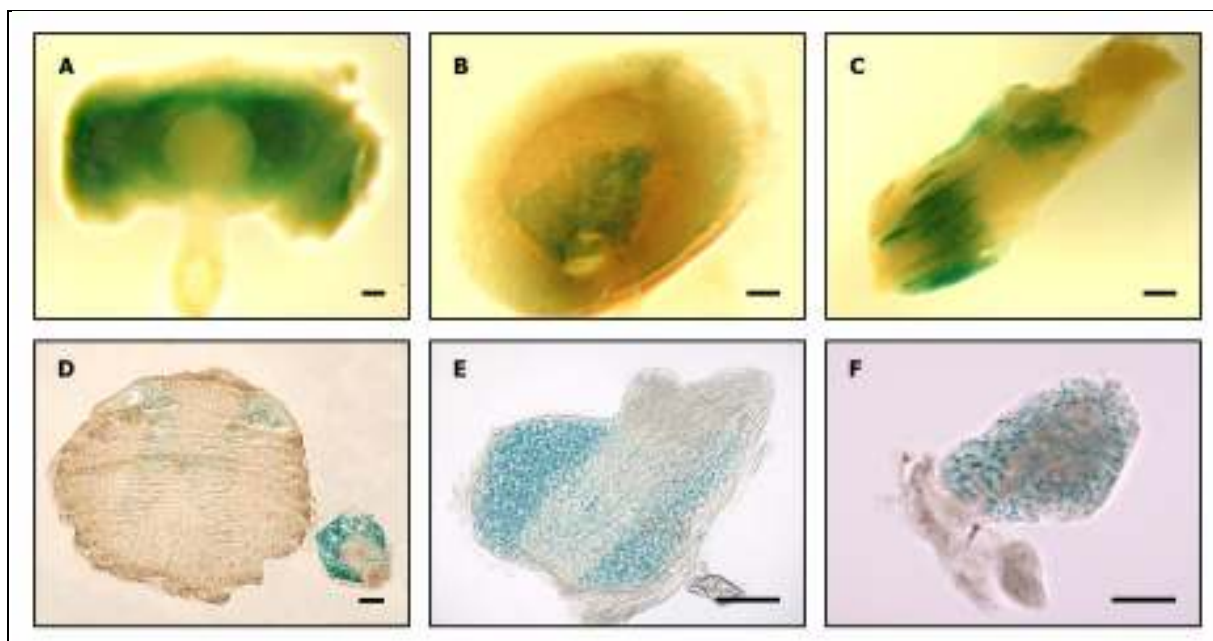
Kako bi provjerili odgovara li uzorak izražaja gena *lacZ* u enteričkom živčanom sustavu transgenične mišje linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*, izražaju bjelančevine STAM2 u miševa divljeg tipa, aktivnost β-galaktozidaze analizirana je X-gal bojanjem. X-gal bojanje duž cijele probavne cijevi pokazalo je jaku β-galaktozidaznu aktivnost u mijenteričkom i submukoznom pleksusu (17A - 17F), kako homozigotnih, tako i heterozigotnih nosioca preinake.

Morfologija i gustoća X-gal bojanja, kao pokazatelja aktivnosti β-galaktozidaze jednake su u homozigotnih i heterozigotnih životinja. Heterozigotni (*Stam2<sup>+Gt1Gaj</sup>*) nosioci mutacije pokazuju nešto manji intenzitet X-gal bojanja, budući da posjeduju samo jedan mutirani alel s ugrađenim vektorom genske zamke koji sadrži transgen *lacZ*, u odnosu na homozigotne (*Stam2<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>*) nosioce koji posjeduju oba takva alela (17G - 17I).



**Slika 17.**  $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg izražaja *Stam2* prisutna je u enteričkom živčanom sustavu. (A - F) Koronarni rezovi želuca (A, B), tankog crijeva (C, D) i debelog crijeva (E, F) debljine 500  $\mu$ m, vizualizirani stereomikroskopom. Uzorci A, C, E uzeti su iz *Stam2*<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>, a uzorci B, D, F iz *Stam2*<sup>+/+</sup> životinja. Plavo obojenje (strelice) u mijenteričkom pleksusu predstavlja  $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost. (G - I) Kriorezovi debelog crijeva debljine 20  $\mu$ m, vizualizirani mikroskopom. Plavo obojenje u mijenteričkom pleksusu (strelice) i submukoznom pleksusu (glava strelice) predstavlja  $\beta$ -galaktozidaznu aktivnost. Gustoća plavog precipitata X-gal bojanja podjednaka je u homozigotnih (G) i heterozigotnih (H) životinja, dok je odsutna u kontrolnim životinjama (I, divlji tip). **m** - mišićni sloj, **p** - podsluznica, **ž** - žlijezde u mukoznom sloju. Crta mjerila - 100  $\mu$ m.

Kao bi provjerali postoji li izražaj gena *Stam2* i u drugim organima perifernog živčanog sustava, analizirana je  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost na nizu organa perifernog živčanog sustava. Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze vidljiva je u trigeminalnom gangliju, spinalnim ganglijima, adenohipofizi i neurohipofizi, te srži nadbubrežne žlijezde (slika 18).

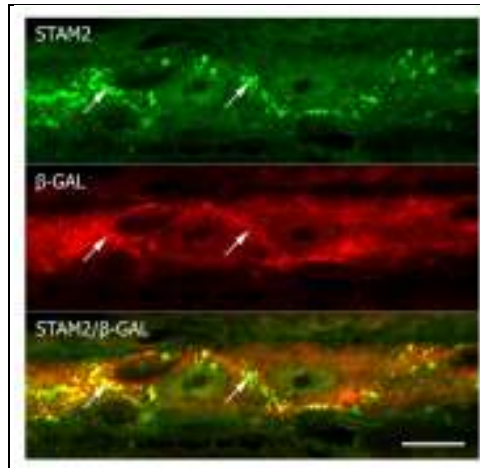


**Slika 18.** Izražaj *Stam2* predstavljen  $\beta$ -galaktozidaznom aktivnošću (X-gal bojanje) u organima perifernog živčanog sustava: (A) hipofiza, (B) nadbubrežna žlijezda, (C) trigeminalni ganglij, (D - F) spinalni ganglij. (D) X-gal bojanje vidljivo je i u sivoj tvari leđne moždine. Crta mjerila - 100  $\mu$ m.

### 5.3.3. Bjelančevina $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg STAM2 prisutna je u STAM2-pozitivnim stanicama perifernog živčanog sustava

Kako bi na razini intramuralnih ganglija dodatno provjerili odgovara li izražaj gena *lacZ* u transgeničnoj mišjoj liniji *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*, izražaju gena *Stam2* normalnih miševa, dvostrukim imunohistokemijskim bojanjem protutijelima STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza, analizirani su kriorezovi heterozigotnih nosioca preinake, koji posjeduju normalan i mutirani alel. Izrazito fluorescentno bojanje, kako STAM2, tako i  $\beta$ -galaktozidaze prisutno je na razini mijenteričkog i submukoznog pleksusa (slika 19). Uočeno poklapanje u razmještaju bjelančevina STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza ukazuje na činjenicu kako X-gal bojanje vjerno prikazuje izražaj *Stam2*.



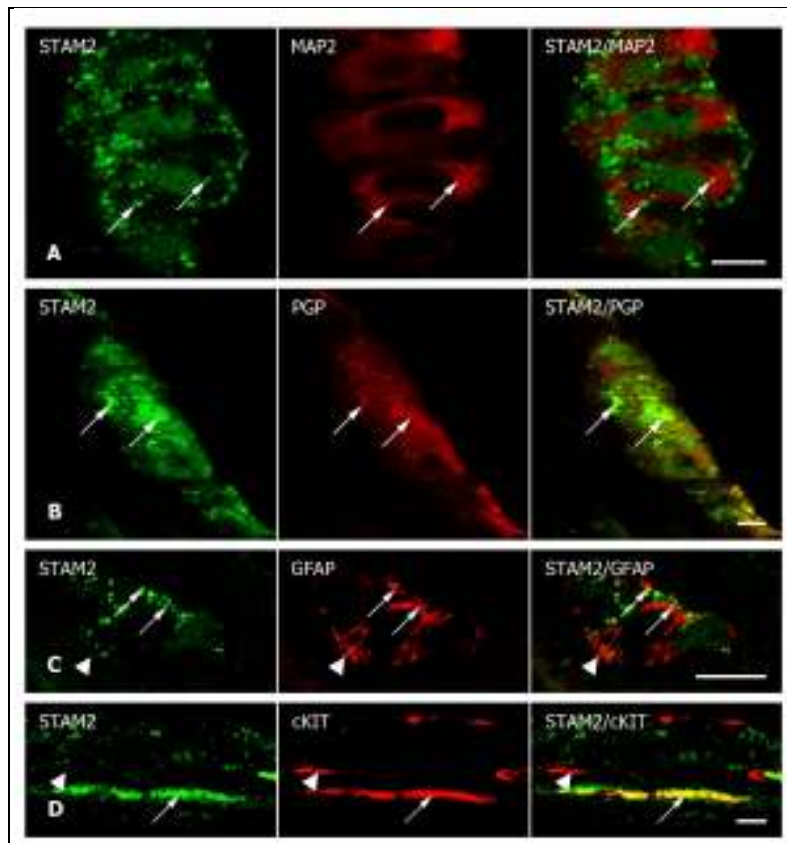


**Slika 19.** Kolokalizacija STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaze u mijenteričkom pleksusu debelog crijeva heterozigotnog miša ( $Stam2^{+/GtlGaj}$ ). Uočeno preklapanje u razmještau bjelančevina (strelice) STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza potvrđuje kako izražaj gena *lacZ* na miševima transgenične linije  $Stam2^{GtlGaj}$  vjerno prikazuje izražaj *Stam2*. Crta mjerila - 10  $\mu$ m.

#### 5.3.4. Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama enteričkog živčanog sustava, te u nekim intersticijskim Cajalovim stanicama

Za određivanje prisutnosti bjelančevine STAM2 u pojedinim stanicama perifernog, odnosno enteričkog živčanog sustava, upotrijebljeni su poprečni rezovi debelog crijeva miševa linije C57Bl/6NCrl, koji posjeduju normalnu bjelančevinu STAM2. Lokalizacija bjelančevine STAM2 istražila se uz pomoć specifičnog STAM2 protutijela, te biljega živčanih stanica, glija stanica i intersticijskih Cajalovih stanica. Kao biljezi živčanih stanica upotrijebljena su protutijela MAP2 i PGP9.5 (engl. *protein gene product 9.5*; bjelančevina produkt gena 9.5). MAP2 je bjelančevina koja se posebice nalazi u dendritima živčanih stanica, dok je PGP9.5 bjelančevina koja se nalazi u tijelu i nastavcima živčanih stanica središnjeg i perifernog živčanog sustava. Protutijelo GFAP korišteno je kao biljeg glija stanica, budući da GFAP boji, osim astrocita i endimskih stanica središnjeg živčanog sustava, i stanice periferne glije, tj. Schwannove stanice, satelitne stanice, te enteričke glija stanice. Kao biljeg intersticijskih Cajalovih stanica, specifičnih mezenhimskih stanica u gastrointestinalnom traktu koje nisu niti živčane, niti mišićne stanice, koristilo se protutijelo c-Kit, kao najvjernija metoda prikazivanja ovih stanica (86).

Imunobojanje protutijelima MAP2 i PGP9.5 pokazalo je kako je STAM2 jako izražen u živčanim stanicama. STAM2 protutijelo pokazuje točkasti signal unutar citoplazme perikariona i nastavaka živčanih stanica, te homogeni signal unutar jezgre. C-Kit imunobojanje pokazalo je signal u stanicama umetnutim između mijenteričkog pleksusa, te u mišićnom sloju. Dvostruko imunohistokemijsko bojanje pokazalo je kako je STAM2 prisutan samo u nekim intersticijskim Cajalovim stanicama, i to onima lokaliziranim u mijenteričkom pleksusu. Enteroglija stanice predočene GFAP protutijelom pokazale su slab signal za bjelančevinu STAM2, što se može usporediti sa signalom u ostalim strukturama probavnog trakta (slika 20).



**Slika 20.** Izražaj *Stam2* u različitim stanicama enteričkog živčanog sustava. Mijenterički pleksus debelog crijeva miševa divljeg tipa. (A) Najjači izražaj *Stam2* nađen je u živčanim stanicama (strelica) što je pokazano s biljegom živčanih stanica MAP2. (B) Dvostruko bojanje STAM2 i biljega živčanih stanica PGP9.5 pokazalo je kako je izražaj *Stam2* u citoplazmi, ali isto tako i u nukleoplazmi (strelice). (C) Vrlo slab STAM2 signal (glava strelice) pronađen je u GFAP-pozitivnim stanicama (strelice) što ukazuje na odsutnost jakog izražaja *Stam2* u enteroglijji. (D) Pronalazak STAM2 protutijela u nekim c-Kit-pozitivnim stanicama, pokazuje izražaj *Stam2* u nekim intersticijskim Cajalovim stanicama (strelica), ali ne u svima (glava strelice). Crte mjerila - 10  $\mu$ m.

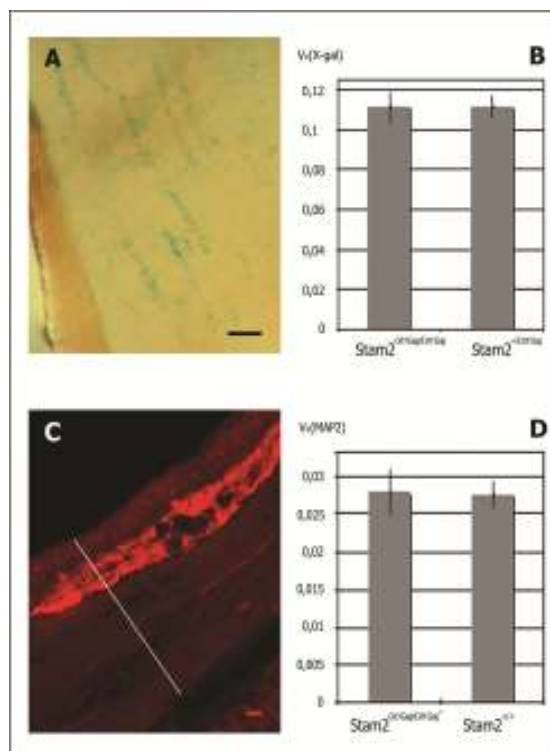
Navedena imunobojanja pokazala su kako je STAM2 lokaliziran uglavnom u živčanim stanicama enteričkog živčanog sustava, te u nekim skupinama intersticijskih Cajalovih stanica.

### **5.3.5. Fenotipske analize perifernog živčanog sustava nisu pokazale razlike između miševa transgenične linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* i miševa divljeg tipa**

Kako bi dobili uvid u moguću ulogu bjelančevine STAM2 u enteričkom živčanom sustavu, učinjena je fenotipska analiza između transgeničnih životinja linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*, te životinja koje posjeduju normalnu bjelančevinu STAM2.

Kako bi provjerili utječe li mutacija unutar gena *Stam2* na morfologiju stanica koje izražavaju gen *Stam2*, uspoređena su *lacZ*-pozitivna područja u intramuralnim ganglijima debelog crijeva homozigotnih (*Stam2<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>*) i heterozigotnih (*Stam2<sup>+/Gt1Gaj</sup>*) nosioca mutacije. Nije pronađena statistički značajna razlika u volumnoj gustoći X-gal pozitivnih područja homozigotnih i heterozigotnih miševa, što ukazuje na činjenicu da se morfologija enteričkog živčanog sustava nije promjenila zbog mutacije u genu *Stam2* (slika 21A i 21B).

Kako bi se usporedila gustoća neurona u mijenteričkom živčanom sustavu između normalnih i transgeničnih životinja, primijenjeno je imunobojanje protutijelom MAP2, specifičnim za živčane stanice. Uspoređena je volumna gustoća MAP2-pozitivnih područja u mišićnom sloju debelog crijeva između homozigotnih (*Stam2<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>*) životinja i životinja divljeg tipa (*Stam2<sup>+/+</sup>*). Volumna gustoća MAP2-pozitivnih područja nije pokazala statistički značajne razlike u raspodjeli živčanog sustava između homozigotnih miševa i miševa divljeg tipa (slika 21C i 21D).



**Slika 21.** Analiza utjecaja *Stam2* na morfologiju mijenteričkog pleksusa. (A) X-gal pozitivna područja (plavo obojenje) u mijenteričkom pleksusu preparata debelog crijeva *Stam2<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>* miša, dobivenog nakon odstranjivanja sluznice i podsluznice. Kvantifikacija X-gal pozitivnih područja dobivena je stereološkim mjerenjima volumne gustoće u referentnom području (stjenka debelog crijeva s odstranjenom sluznicom). Crta mjerila - 100  $\mu\text{m}$ . (B) Srednje vrijednosti volumnih gustoća X-gal pozitivnih područja u debelom crijevu homozigotnih i heterozigotnih miševa (dvije životinje po genotipu) pokazuju ravnomjernu prisutnost X-gal područja u *Stam2<sup>Gt1Gaj/Gt1Gaj</sup>* i *Stam2<sup>+/Gt1Gaj</sup>* miševa. (C) Mišićni sloj debelog crijeva (širina mišićnog sloja prikazana je bijelom crtom) s MAP2-pozitivnim područjem prikazan konfokalnim mikroskopom. Crta mjerila - 10  $\mu\text{m}$ . (D) Srednje vrijednosti MAP2-pozitivnih područja u referentnom području mišićnog sloja homozigotnih miševa i miševa divljeg tipa (dvije životinje po genotipu). Nisu opažene statistički značajne razlike MAP2-pozitivnih područja između obje linije miševa ( $P < 0.1$ ). Okomite crte na oba grafa pokazuju standardnu pogrešku.

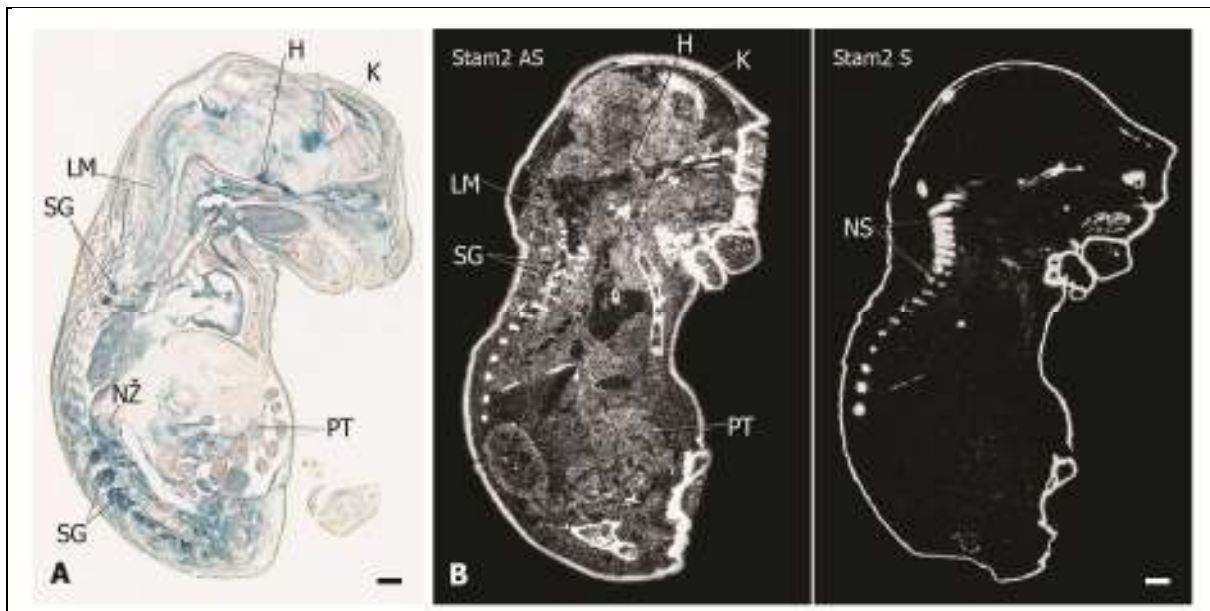
## 5.4. STAM2 tijekom razvoja živčanog sustava miša

### 5.4.1. Gen *Stam2* izražen je tijekom razvoja živčanog sustava miša

Izražaj gena *Stam2* tijekom razvoja određen je pomoću lokalizacije transkripta mRNA za gen *Stam2* u 16,5 dana starim zamecima miša postupkom hibridizacije RNA *in situ*.

Transkript gena *Stam2* rasprostranjen je tijekom razvoja u različitim regijama živčanog sustava (slika 22B).

U 16,5 dana starim zamecima transkript mRNA gena *Stam2* prisutan je duž cijele kralježnične moždine, u području krovne ploče, bazalne ploče, ploče dna, te u području raphe i sive tvari. Izražaj gena *Stam2* vidljiv je i kroz cijelu produljenu moždinu, u području ploče dna, raphe, te sive tvari. Signal je vidljiv i u telencefalonu, u ventrikularnoj i marginalnoj zoni, te u području kortikalne ploče, dok je najjači izražaj gena *Stam2* u intermedijarnoj zoni. Signal transkripta mRNA gena *Stam2* primjećuje se još u području hipokampusa, zatim u olfaktornim bulbusima, te u trigeminalnom gangliju, spinalnim ganglijima, hipofizi i srži nadbubrežne žlijezde (tablica 6).



**Slika 22.** Izražaj *Stam2* u 16,5 dana starim zamecima prikazan X-gal bojanjem (A) i hibridizacijom RNA *in situ* (B). (A)  $\beta$ -galaktosidazna aktivnost na kriorezovima zametaka E16,5. (B) *Stam2* hibridizacija RNA *in situ* na zamecima E16,5. Lijevo je prikazana „antisense“ (AS) *Stam2* specifična sonda, a desno „sense“ (S) *Stam2* specifična sonda koja predstavlja negativnu kontrolu. H - hipofiza, K - korteks, LM - leđna moždina, NŽ - nadbubrežna žlijezda, SG - spinalni ganglij, PT - probavni trakt, NS - nespecifično bojanje hrskavice. Crta mjerila - 1 mm.

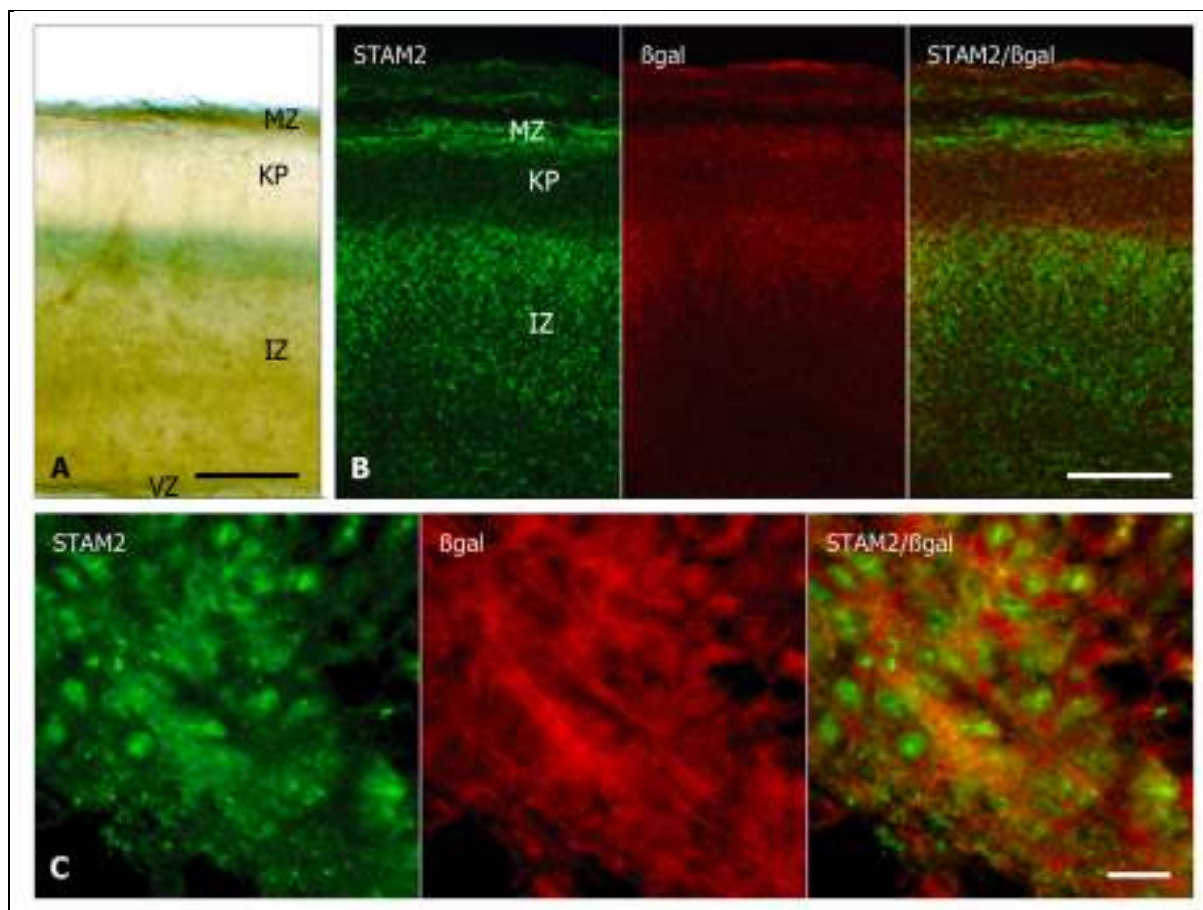
#### 5.4.2. Bjelančevina STAM2 prisutna je tijekom razvoja živčanog sustava miša

Budući da prisutnost mRNA gena *Stam2* u razvoju miševa divljeg tipa ne mora značiti da će se ona prevesti u bjelančevinu, za određivanje prisutnosti bjelančevine STAM2 primijenjen je postupak imunohistokemije. Kako bi se provjerilo postoji li normalna bjelančevina STAM2 u razvoju živčanog sustava miša, upotrijebljeno je protutijelo specifično za bjelančevinu STAM2.

U zametaka starih 11,5 dana bjelančevina STAM2 prisutna je u notokordu, te duž cijele neuralne cijevi.

U zamecima starim 16,5 dana bjelančevina STAM2 prisutna je duž cijele kralježnične moždine; u području krovne ploče i bazalne ploče signal je nešto jači nego u području ploče dna, u području raphe i sive tvari. STAM2 bojanje vidljivo je i kroz cijelu produljenu moždinu, u području ploče dna, raphe, te sive tvari. STAM2 imunobojanje prisutno je i u telencefalonu (slika 23B). Imunohistokemijski signal je u kortikalnoj ploči nešto slabiji, a u intemedijarnoj zoni nešto jači nego kod hibridizacije RNA *in situ*. U ventrikularnoj i marginalnoj zoni imunobojanje bjelančevine STAM2 jednako je kao i signal transkripta mRNA. Bjelančevina STAM2 prisutna je također u području hipokampusa, zatim u olfaktornim bulbusima, te u trigeminalnom gangliju, spinalnim ganglijima, hipofizi i srži nadbubrežne žlijezde.

Iz rezultata pokusa vidljivo je kako je bjelančevina STAM2 u razvoju živčanog sustava miša prisutna u istim strukturama kao i transkript gena *Stam2* (tablica 6).



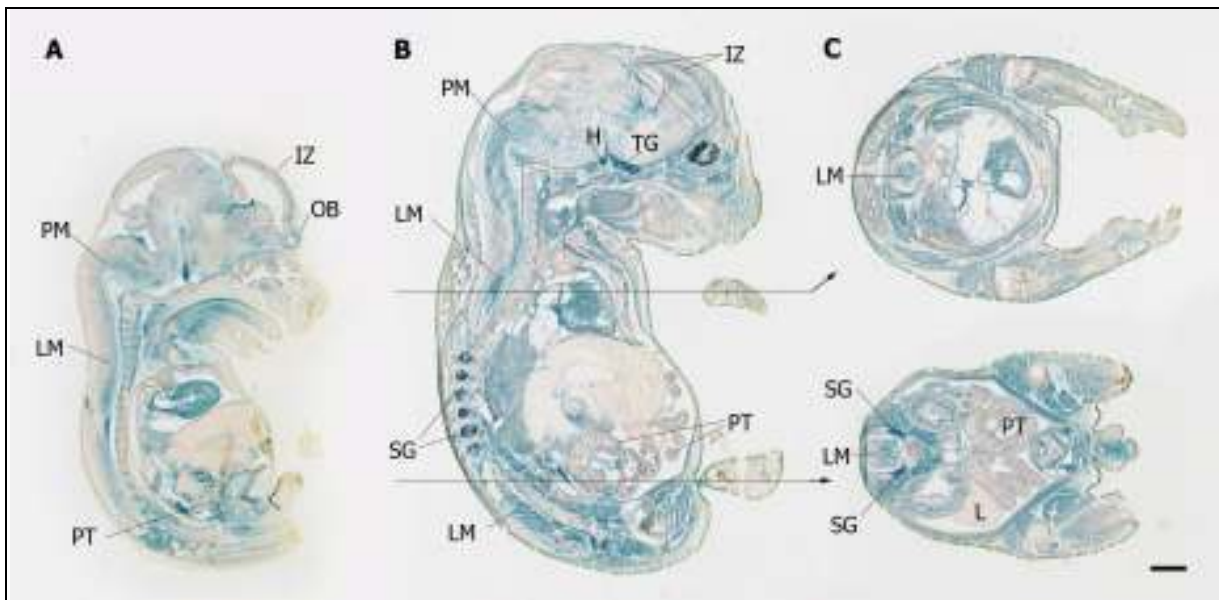
**Slika 23.** Izražaj *Stam2* u zamcima E11,5 i E16,5 prikazan imunobojanjem STAM2 protutijelom potvrđuje uzorak izražaja dobiven X-gal bojanjem. (A)  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost prikazana X-gal bojanjem na sagitalnom rezu korteksa zametaka E16,5. (B) Imunohistokemijska analiza protutijelima specifičnim za STAM2 i  $\beta$ -galaktozidazu na sagitalnim rezovima telencefalona zametaka E16,5. (C) Kolokalizacija bjelančevina STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza u ventralnom dijelu neuralne cijevi zametaka E11,5. **MZ** - marginalna zona, **KP** - kortikalna ploča, **IZ** - intermedijarna zona, **VZ** - ventrikularna zona. Crta mjerila (A - B) - 100  $\mu$ m; (C) - 10  $\mu$ m.

#### 5.4.3. Stopljena bjelančevina STAM2- $\beta$ -galaktozidaza prisutna je tijekom razvoja živčanog sustava miša

Kako bi se istražila rasprostranjenost izražaja gena *Stam2* tijekom razvoja živčanog sustava, postupak histokemijskog određivanja aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze pomoću supstrata X-gala, zbog lakoće izvedbe, proveo se na nizu razvojnih stadija razvitka središnjeg i perifernog živčanog sustava. Bojanje se provodilo na homozigotnim nosiocima preinake transgenične miše linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup>, a analizom su obuhvaćeni zamci starosti 11,5, 14,5 i 16,5 dana (tablica 6).

Izražaj gena *Stam2* u živčanom sustavu po prvi se puta pojavljuje u zamecima starim 11,5 dana, u notokordu, te u neuralnoj cijevi u području ploče dna i bazalne ploče.

Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze u 14,5 dana starim zamecima prisutna je u kralježničnoj moždini, u području krovne ploče, ploče dna i u području raphe, a vrlo je slaba u sivoj tvari. U produljenoj moždini i ponsu, aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze prisutna je u ploči dna, te u ventralnom djelu područja raphe, dok je u sivoj tvari vrlo slaba aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze. U ovom stadiju pojavljuje se aktivnost u telencefalonu, i to u intermedijarnoj zoni. Signal X-gal bojanja vidljiv je još u olfaktornim bulbusima, dok je nešto slabiji signal zamijećen u trigeminalnom gangliju, spinalnim ganglijima, te u hipofizi (slika 24A).



**Slika 24.** Vizualizacija  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti histokemijskim bojanjem X-galom na kriorezovima homozigotnih životinja. (A)  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost na sagitalnom kriorezu zametka E14,5. (B)  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost na sagitalnom kriorezu zametka E16,5. (C)  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost na horizontalnim kriorezovima zametaka E16,5; lokalizacija reza prikazana je vodoravnim strelicama na rezu B. **IZ** - intermedijarna zona korteksa, **LM** - leđna moždina, **OB** - olfaktorni bulbus, **PM** - produljena moždina, **PT** - probavni trakt, **SG** - spinalni ganglij. Crta mjerila - 1 mm.

U 16,5 dana starim zamecima  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost prisutna je u kralježničnoj moždini u području ploče dna, te sive tvari, dok u području krovne i bazalne ploče aktivnost izostaje. U produljenoj moždini bojanje je prisutno u svim dijelovima, u području ploče dna, raphe, te



sive tvari. U telencefalonu se pojavljuje slab signal u ventrikularnoj i marginalnoj zoni, te u području kortikalne ploče, dok u intermedijarnoj zoni X-gal bojanje pokazuje najjači signal. Slab signal X-gal bojanja primjećuje se u području hipokampusa, dok je nešto jači signal vidljiv u olfaktornim bulbusima, trigeminalnom gangliju, spinalnim ganglijima, hipofizi, te srži nadbubrežne žlijezde (slika 24B i 24C).

#### **5.4.4. Bjelančevina $\beta$ -galaktozidaza kao biljeg STAM2 prisutna je u STAM2-pozitivnim stanicama tijekom razvoja živčanog sustava**

U skladu s rezultatima dobivenim postupkom hibridizacije RNA *in situ* i postupkom imunohistokemije, X-gal bojanje koje ukazuje na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze, pokazalo je jednaku raspodjelu signala u razvojnim stadijima živčanog sustava miša. U nekim se regijama živčanog sustava u razvitku razlikuje intenzitet prisutnosti izražaja gena *Stam2*, bjelančevine STAM2, te aktivnosti stopljene bjelančevine STAM2- $\beta$ -galaktozidaza. Općenito, X-gal bojanje jest više ograničeno no što je to imunobojanje bjelančevine STAM2 ili hibridizacijski signal transkripta mRNA gena *Stam2*, što ukazuje na činjenicu da se *Stam2* izražaj dobiven X-gal bojanjem podudara s regijama najjačeg izražaja mRNA *Stam2* (23A, 23B).

Dvostrukim imunohistokemijskim bojanjem s protutijelima specifičnim za bjelančevine STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza, na rezovima 11,5 i 16,5 dana starih heterozigotnih zametaka, nosioca mutacije (*Stam2*<sup>+/*Gt1Gaj*</sup>), učinjena je dodatna provjera promatranog X-gal bojanja. Oba protutijela pokazala su jak fluorescentni signal u regijama izražaja *Stam2* koja su pokazana i X-gal bojanjem. Međutim, oba su protutijela pokazala manje restriktivni intenzitet bojanja, nego što je to slučaj s X-gal bojanjem, što dokazuje da X-gal bojanje ne pokazuje regije vrlo slabog, ubikvitarnog izražaja *Stam2*. Bjelančevine STAM2 i  $\beta$ -galaktozidaza prisutne su u istim stanicama u razvoju živčanog sustava, međutim njihova unutarstanična raspodjela je različita (slika 23C). STAM2 je prisutan u nastavcima stanica, u obliku točkastog signala, također je prisutan u perikarionu, te u jezgri nekih stanica.  $\beta$ -galaktozidaza daje homogeniji signal unutar cijele citoplazme. U nekim stanicama prisutne su sitne točkice koje predstavljaju  $\beta$ -galaktozidazne nakupine (87, 88).

**Tablica 6.** Usporedba izražaja gena *Stam2* tijekom razvoja živčanog sustava određena hibridizacijom RNA *in situ* (ISH), imunohistokemijom (IHC) i X-gal bojanjem. “-“ - nema signala, “-/+“ - djelomičan signal, “+“ - slab signal, “++“ - jak signal, “+++“ - vrlo jak signal.

Regija	E11,5		E14,5	E16,5		
	X-gal	IHC	X-gal	X-gal	ISH	IHC
Notokord	+	+				
Kralježnična moždina (krovna ploča)	-	+	+	-	+	+/-
Kralježnična moždina (bazalna ploča)	+	++	-	-	+	+/-
Kralježnična moždina (ploča dna)	+	+++	+	+	+	+
Kralježnična moždina (raphe)			+	+	+	+
Kralježnična moždina (siva tvar)			+/-	+	+	+
Produžena moždina, pons (ploča dna)			+	+	+	+
Produžena moždina, pons (raphe)			+	+	+	+
Produžena moždina, pons (siva tvar)			+/-	+	+	+
Telencefalon (ventrikularna zona)			-	+/-	+	+
Telencefalon (intermedijarna zona)			+	++	++	+++
Telencefalon (kortikalna ploča)				+/-	+	+/-
Telencefalon (marginalna zona)				+	+	+
Hipokampus				+/-	+	+
Olfaktorni bulbus			+	+	+	+
Trigeminalni ganglij			+/-	+	+	+
Spinalni ganglij			+/-	+	+	+
Hipofiza			+/-	+	+	+
Srž nadbubrežne žlijezde				+	+	+

U skladu s postavljenim ciljevima rada navedenim pokusima pokazano je kako uzorak izražaja gena *lacZ* u transgeničnim zamecima mišje linije *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>*, odgovara uzorku izražaja gena *Stam2* i bjelančevine STAM2 tijekom embrionalnog razvoja živčanog sustava miša.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. STAM2 na staničnoj razini u živčanom sustavu miša

Provedeno istraživanje predstavlja prvu sustavnu analizu svih razina izražaja gena *Stam2* u živčanom sustavu, te unutar živčanih stanica. Većina dosadašnjih istraživanja o ulozi *Stam2* molekule provedena su u uvjetima *in vitro* na kulturi stanica koje nisu živčanog podrijetla (29, 30, 33, 43, 81). Budući da je STAM2 jako izražen u živčanom sustavu, istraživanje unutarstaničnog rasporeda u stanicama živčanog sustava nužan je uvjet za daljnje razumijevanje uloge ovoga gena, pogotovo njegove uloge u živčanom sustavu.

#### 6.1.1. Bjelančevina STAM2 prisutna je na endosomima i u citosolu živčanih stanica

Imunohistokemijsko bojanje živčanih stanica pokazalo je kako je bjelančevina STAM2 prisutna difuzno u citoplazmi, kako u perikarionu, tako i u nastavcima živčanih stanica, u obliku točkastog signala. Dvostruko imunocitokemijsko bojanje s protutijelom STAM2, te protutijelom EEA1, kao biljekom ranih endosoma, pokazalo je kako je STAM2 smješten u točkastim strukturama unutar citoplazme koje su dijelom pozitivne na EEA1. Također, kolokalizacijske studije su pokazale kako STAM2 međudjeluje s ostalim bjelančevinama kompleksa ESCRT-0 (STAM1 i HRS) u živčanim stanicama.

Ovakav raspored bjelančevine STAM2 dodatno potvrđuje njezino sudjelovanje u početnom dijelu endosomskog razvrstavajućeg kompleksa (ESCRT) kojim se ubikvitinirane bjelančevine usmjeruju prema razgradnji u lizosomima (53). Ubikvitinirane bjelančevine namijenjene razgradnji u lizosomima usmjeruju se kroz četiri bjelančevinska kompleksa: ESCRT-0, -I, -II i -III. Vezanje ubikvitina za te bjelančevine svojevrsan je signal koji služi usmjeravanju bjelančevina prema daljnjoj razgradnji (25). Ubikvitin-vezujuće domene kompleksa ESCRT-0 prve prepoznaju kovalentno vezan ubikvitin. ESCRT-0 čine redom molekule HRS, STAM1 i STAM2, koje su i same ubikvitinirane i nalaze se na ranim endosomima. Djelovanje kompleksa ESCRT-0 započinje vezivanjem molekule HRS za klatrin koji se nalazi sa citosolne strane ranih endosoma. Za molekule STAM je pokazano kako također mogu vezati klatrin, iako funkcionalna važnost ove interakcije nije poznata, budući da se molekule STAM vežu za molekulu HRS (89). Podjedinice kompleksa ESCRT-0

vežući se na nizvodne molekule, potom predaju ubikvitinirani sadržaj ostalim podjedinicama kompleksa ESCRT (ESCRT-I, -II), koje svojim ubikvitin-vezujućim domenama prihvaćaju bjelančevine u membranske invaginacije formirane od membrane endosoma koje u konačnici završavaju formiranjem intraluminalnih mjehurića multivezikularnih tjelešaca. Sadržaj ovih intraluminalnih mjehurića razgradi se kada se multivezikularna tjelešca spoje s lizosomima. Posljednja podjedinica kompleksa ESCRT, ESCRT-III, djeluje obrnuto, tj. privlači deubikvitinirane enzime koji potom cijepaju kovalentnu vezu između bjelančevine namijenjene razgradnji i ubikvitina, kako bi se sam ubikvitin otpustio u citosol prije zatvaranja intraluminalnih mjehurića.

Nedavne studije pokazale su kako ESCRT ne posreduje samo u lizosomskoj degradaciji receptora čimbenika rasta i citokina, već je također uključen u regulaciju brojnih drugih bjelančevina plazma membrane, kao što je receptor za neurotransmiter GABA (engl. *gamma-aminobutyric acid*; gama-aminomaslačna kiselina) (90), čime bi se mogla barem djelomično objasniti jaka izraženost STAM2 i ostalih podjedinica ESCRT-0 u živčanim stanicama. Zanimljivo je da je za negativni regulator degradacije GABA receptora, GISP (engl. *G-protein coupled receptor-interacting scaffolding protein*; spregnuti receptor povezan s G-bjelančevinama-interaktivna građevna bjelančevina) pokazano kako reagira s molekulom *Tsg101* (engl. *tumor susceptibility gene 101*, gen osjetljiv na tumor 101), podjedinicom kompleksa ESCRT-I. Utišavanje *Tsg101* ili preizraženost molekule GISP, dovodi do usporene degradacije receptora, što upućuje na moguću činjenicu kako bjelančevina GISP prilagođava endosomski promet posredovan kompleksom ESCRT (90, 91).

Analize unutarstaničnog rasporeda pokazale su kako je STAM2 prisutan difuzno u citoplazmi, kako u tijelu, tako i u nastavcima živčanih stanica u obliku točkastog signala. Međutim, iako je pokazana kolokalizacija STAM2 s biljegom ranih endosoma, ova kolokalizacija je samo djelomična. Također, postupkom substanične frakcionacije pokazano je kako je STAM2 podjednako zastupljen u frakciji membrana i organela (koja vjerojatno odgovara smještaju STAM2 na membrani endosoma), te u frakciji citosola, što upućuje na moguće djelovanje molekule STAM2 samostalno ili u kompleksu s drugim bjelančevinama u citosolu, neovisno o endosomima. Pronalazak bjelančevine STAM2 u frakciji membrana i citosola potvrđuje rezultate istraživanja Takata i suradnika, koji su napravili substaničnu frakcionaciju na modelu mišjih stanica melanoma B16-F1 (29). Oni su rezultate svog istraživanja pokušali

opravdati nedostatkom eksperimentalne metode pri čemu nakon diferencijalnog centrifugiranja prilikom izdvajanja citosolne frakcije postoji mogućnost miješanja s frakcijom membrana. Kao razlog pronalaska STAM2 u citosolnoj frakciji živčanih stanica nikako ne bi pripisali nedostatak tehnike, budući da se citosolna frakcija izdvaja puferom koji sadrži digitonin, deterđent koji reagira s kolesterolom, te stvara pore koje omogućuju izlazak samo otopljenih citosolnih bjelančevina, stoga se u toj frakciji ne provodi centrifugiranje i ne postoji mogućnost miješanja pojedinih frakcija.

Bache i suradnici nekoliko su godina kasnije potvrdili nalaz Takate i suradnika na tumorskim stanicama HEP-2 (engl. *human epidermoid carcinoma*; humani epidermoidni karcinom). Pokazali su kako je STAM2 prisutan i u citosolnoj i u membranskoj frakciji, a koimunoprecipitacijom su pokazali kako se bjelančevina STAM2 u obje frakcije pojavljuje u kompleksu s bjelančevinom HRS (35).

Pronalazak STAM2 u citosolnoj i membranskoj frakciji živčanih stanica potvrđuje nalaze Takata i suradnika, te Bache i suradnika (29, 35).

Pronalazak molekule STAM2 u različitim frakcijama nije nimalo začuđujući, budući da je STAM2 sastavljena od modularnih domena koje joj omogućuju međudjelovanje s mnogim drugim bjelančevinama. Ubikvitin i ubikvitinirane bjelančevine vezuju se za ubikvitin vezujuću domenu (UIM), kao i za N-terminalnu domenu VHS (33). STAM2 je također monoubikvitiniran, vjerojatno na nekoliko različitih mjesta na način na koji zahtjeva funkcioniranje navedenih domena. Nije poznato veže li se ubikvitin odvojeno za domene VHS i UIM (2 ubikvitin veze po STAM2) ili dvije ubikvitin-vezujuće domene imaju sinergistički učinak, tako da povećaju ukupni afinitet ubikvitina naspram afinitetu koji bi imala svaka domena pojedinačno. Tijekom endocitoze, ubikvitin dolazi u obliku pojedinačnih molekula ubikvitina koje se slobodno nalaze u citosolu ili iz monoubikvitiniranih supstrata, a kasnija forma liganda, tj. vezanog ubikvitina može stvarati veze različitim afinitetom od slobodnog ubikvitina (92).

Nije poznato zašto je sama molekula STAM2 ubikvitirana. Poznato je kako se ubikvitinacija receptora događa na nekoliko razina endocitotskog puta, a čini se kako je kontinuirana ubikvitinacija neophodna za učinkovitu degradaciju (44).

Osim monoubikvitinacije, bjelančevine uključene u proces endocitoze podvrgnute su tirozinskoj fosforilaciji, u nekim slučajevima posredovanoj obitelji SRC kinaza, u odgovoru na citokine ili faktore rasta vezane za receptor tirozinskih kinaza (93). Fosforilacija tirozinskih ostataka na STAM2 i HRS događa se tijekom endocitoze. Ove dvije post-translacijske modifikacije čine se povezanim, budući da je u nekim slučajevima tirozinska fosforilacija uvjetovana monoubikvitinacijom (94). Također, pokazano je kako kod molekule HRS, fosforilacija može zahtijevati direktno međudjelovanje ubikvitiniranih receptora i HRS. Tipična biološka uloga fosforilacije još uvijek nije u potpunosti poznata, ali u slučaju molekule HRS pokazala se kako predstavlja regulacijski mehanizam koji potiče daljnje specifično djelovanje molekule HRS (93). Važnost fosforilacije kod molekule STAM2 vjerojatno je slična onoj u molekule HRS, budući da smještaj na membrani ranih endosoma molekula STAM2 zahvaljuje vezanjem svojih domena CC i SSM za bjelančevinu HRS (29, 34).

Novija istraživanja pokazala su određeni stupanj kolokalizacije bjelančevine STAM2 s nekoliko biljega rane egzocitoze, koji uključuju biljeg *cis*-strane Golgijevog tjelešca, GM130 (engl. *cis-Golgi marker 130*; biljeg *cis* strane Golgijevog tjelešca), te biljeg posredovanja endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tjelešca, ERGIC-53 (engl. *ER-Golgi intermediate compartment*; odjeljak posredovanja endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tjelešca). Navedeno istraživanje ukazuje na još jednu moguću ulogu molekule STAM2, a to je djelovanje na morfologiju Golgijevog aparata. Preizraženost bjelančevine STAM2 u staničnoj kulturi HeLa stanica uzrokuje rasap Golgijevog aparata, dok nedostatak STAM2 uzrokuje zgušnjavanje Golgijevog aparata u tvorbu sličnu kugli. Na taj način djelovanje STAM2 povezano je s COPII (engl. *coat protein complex II*, obložni bjelančevinski kompleks II) bjelančevinama, a to su molekule koje reguliraju transport između endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tjelešca (43). Budući da u ovom radu nisu ispitivani navedeni biljezi ne isključuje se moguća uloga molekule STAM2 unutar kompleksa COPII u živčanim stanicama.

### **6.1.2. Bjelančevina STAM2 prisutna je u jezgri živčanih stanica**

Imunobojanje specifičnim protutijelom STAM2 pokazalo je kako je, osim u točkastim strukturama unutar citoplazme, STAM2 prisutan u obliku homogenog jakog signala i u jezgri

živčanih stanica. Kako bi dokazali da se ne radi o nespecifičnosti protutijela, postupak imunohistokemije na tkivima središnjeg i perifernog živčanog sustava, te imunocitokemije na primarnim kulturama živčanih stanica kore velikog mozga ponovljeni su, s tada, jedina tri komercijalno dostupna protutijela različitih proizvođača. Sva tri protutijela pokazala su sličan signal bjelančevine STAM2 u živčanim stanicama; točkasti signal unutar citoplazme perikariona i nastavaka živčanih stanica, te homogeni signal unutar jezgre. Dodatna potvrda lokalizacije bjelančevine STAM2 u jezgri živčanih stanica dobivena je postupkom substancične frakcionacije. Imunobojanje bjelančevina frakcije jezgara postupkom „western blot“ s protutijelom STAM2, pokazalo je nalaz bjelančevine mase nešto veće od 58 kDa (što je očekivana masa ubikvitinirane bjelančevine STAM2), što je dokaz da je bjelančevina STAM2 zaista prisutna u jezgri živčanih stanica.

Nalaz STAM2 u frakciji jezgri suprotan je od rezultata dobivenih substancičnom frakcionacijom Takata i suradnika, te Bache i suradnika (29, 35). Međutim treba imati na umu kako su prethodne grupacije svoje pokuse temeljile na tumorskim staničnim linijama (B16-F1 i HEP-2) koje ne moraju predstavljati vjeran odraz izražaja bjelančevine u normalnoj stanici. U istraživanjima navedenim u ovom radu po prvi se puta pokazala prisutnost bjelančevine STAM2 u jezgri živčanih stanica. Iako u jezgri glija stanica središnjeg i perifernog živčanog sustava nije uočena bjelančevina STAM2, mogućnost postojanja bjelančevine STAM2 u nekim drugim stanicama ovaj rad ne isključuje.

Osim u endosomskoj aktivnosti, STAM2 sudjeluje također u unutarstaničnom prijenosu podražaja citokinske signalizacije, što potencijalno može objasniti ovakav unutarstanični raspored STAM2 i specifični nuklearni izražaj u živčanim stanicama. Bjelančevina STAM2 visoko je fosforilirana na tirozinskim ostacima, a uključena je u odgovor na citokine (IL-2, IL-3, GM-CSF) i čimbenike rasta (EGF, PDGF, HGF). Bjelančevina STAM2 na C-terminalnom kraju posjeduje domenu ITAM koja vezuje tirozinske kinaze JAK2 i JAK3, te je dokazano da sudjeluje u citokinima posredovanoj indukciji gena c-myc odgovornog za pokretanje staničnog ciklusa i sintezu DNA (29, 30, 31).

Budući da važnu ulogu u prijenosu podražaja nizvodno od JAK2 i JAK3 ima transkripcijski čimbenik STAT5 (engl. *signal transducers and activators of transcription 5*; prijenosnici podražaja i aktivatori transkripcije 5) koji se premješta u jezgru i potiče transkripciju ciljanih gena na poticaj citokina, kao što je IL-3 (95), moguća je uloga molekule STAM2 kao

molekule prilagođivača u signalnom putu JAK-STAT. Još uvijek se malo zna o nizvodnoj regulaciji STAM2 u putu induciranom bjelančevinom c-myc, međutim nitko do sada još nije pokazao kako se STAM2 translocira u jezgru nakon stimulacije s navedenim citokinima, posebice što bioinformatičke analize još nisu pokazale postojanje domene koja bi imala mogućnost dopremanja molekule do jezgre.

S druge strane, mnogo je dokaza koji ukazuju na činjenicu da bjelančevine kompleksa ESCRT mogu također sudjelovati izravnije u staničnoj signalizaciji, kako u citoplazmi, tako i u jezgri, kroz izravna međudjelovanja s bjelančevinama signalizacije. Pokazano je kako nekoliko bjelančevina uključenih u kompleks ESCRT ima dodatnu ulogu u jezgri stanice. Studije substaničnog smještaja pokazale su kako je bjelančevina CHMP1 (engl. *chromatin modifying protein*; bjelančevina izmjene kromatina) koja je dio kompleksa ESCRT-III, pronađena u citosolnoj frakciji, ali i u frakciji jezgre, budući da posjeduje signal za lokalizaciju bjelančevine u jezgri (NLS; engl. *nuclear localization signal*), a pokazano je kako igra ulogu u pregradnji kromatina (96). Nadalje pronađeno je kako se CHMP3, dio kompleksa ESCRT-III, osim na endosomima, nalazi i u jezgri stanice (97). Bjelančevina TSG101, dio kompleksa ESCRT-I, veže se na glukokortikoidne receptore, te inhibira transkripcijsku aktivaciju receptora (98). Također postoje bjelančevine koje nisu dio kompleksa ESCRT, ali su uključene u proces endocitoze, a pokazano je kako povezuju endocitezu i transkripcijsku regulaciju. Primjerice, Eps15 (engl. *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*; klon br. 15 supstrata biokemijskog puta receptora epidermalnog čimbenika rasta), epsin i  $\beta$ -arestin, koji su komponente klatrinskog omotača vezikula, sudjeluju u prijenosu tvari iz citoplazme u jezgru (99, 100, 101, 102). Osim detaljnije karakterizacije nukleo-citoplazmatskog prijenosa ovih bjelančevina, te bjelančevina koje međudjeluju s njima, moguća uloga ovih endocitotskih bjelančevina u jezgri još uvijek je nepoznata. Regulacija signala jezgre kojim djeluju ove bjelančevine također je još uvijek nejasna. Nešto je bolje razjašnjen put u kojem Rab5 (engl. *Rab protein 5*; bjelančevina Rab 5) i bjelančevine APPL1 i APPL2 (engl. *beta amyloid protein precursor-like*; bjelančevina slična preteči bjelančevine beta amiloid) djeluju kao posrednici u signalizaciji između plazma membrane i jezgre. APPL1 i APPL2 nužni su za staničnu proliferaciju, a njihova aktivnost ovisi o vezanju za bjelančevinu Rab5, koja se normalno nalazi na membrani ranih endosoma. Nakon produljenog djelovanja EGF, APPL1 i APPL2 premještaju se s membrane ranih endosoma u jezgru, gdje se vezuju s NuRD/MeCP1 kompleksom, multibjelančevinskim kompleksom koji



sudjeluje u pregradnji kromatina i deacetilaciji histona (103). Sve ove studije zajedno povećavaju vjerojatnost da neke bjelančevine uključene u proces endocitoze imaju direktnu ili indirektnu ulogu u transkripcijskoj regulaciji, te da endocitoza i signalizacija ipak nisu zasebni procesi koji postoje neovisni u stanici. Budući da je u ovom radu po prvi puta pokazano kako je molekula STAM2, koja je inače prisutna u citosolu i na membrani ranih endosoma, prisutna u jezgri živčanih stanica, postoji mogućnost kako i STAM2 ima dvojaku ulogu u različitim staničnim odjeljcima, a moguće je da uloga ovisi o jačini izražaja koju stanica posjeduje prema genu *Stam2*.

### **6.1.3. Bjelančevine koje međudjeluju s bjelančevinom STAM2, osim bjelančevine AMSH, nisu smještene u jezgri živčanih stanica**

Imunohistokemijskim analizama pokazano je kako ostale bjelančevine kompleksa ESCRT-0 (STAM1 i HRS) nisu smještene u jezgri živčanih stanica.

Nadalje, osim podjedinica kompleksa ESCRT, postoje bjelančevine koje imaju sposobnost međudjelovanja s jednom ili više komponenti ESCRT-a, a njihov je broj svakim danom sve veći, što ukazuje na kompleksnost ovog procesa (44).

Kako bi provjerili jesu li neke druge molekule s kojima STAM2 intenzivno međudjeluje, smještene u jezgri, učinjene su imunohistokemijske analize s bjelančevinama AMSH i UBPY. Imunobojanje s UBPY pokazalo je, poput STAM1 i HRS, većinom signal u nastavcima živčanih stanica. Imunobojanje s AMSH pokazalo je također signal u citoplazmi nastavaka živčanih stanica, međutim u nekim regijama mozga pokazalo je točkasti signal koji okružuje jezgrinu membranu. Ovakav razmještaj bjelančevine AMSH ne začuđuje, budući da AMSH posjeduje signal za lokalizaciju bjelančevine u jezgri (NLS) (104). Budući da se smatra kako se proces ulaska bjelančevina u jezgru sastoji od dva važna koraka; prvog u kojem se bjelančevine vežu za pore na jezgrinoj ovojnici u procesu koji ne zahtjeva energiju, te drugog koji zahtjeva energiju, a u kojem se događa prijenos bjelančevina kroz kanale porinih kompleksa unutar jezgre (105), postoji mogućnost kako samo jedan NLS nije u mogućnosti dovesti molekulu AMSH unutar jezgre, već svoju ulogu u jezgri obavlja vezanjem na kanale pora.

Ubikvitin-specifične proteaze AMSH i UBPY najvažniji su enzimi koji vrše deubikvitinaciju u kompleksu ESCRT sisavaca. Ovi enzimi vežu se za bjelančevine CHMP kompleksa ESCRTIII pri čemu vrše deubikvitinaciju, tj. odstranjuju ubikvitin s membranskih bjelančevina u citosol, prije no što se bjelančevine namijenjene razgradnji ne invaginiraju u endosomske membrane multivezikularnih tjelešaca (106, 107). Međutim, povezanost između molekula AMSH, UBPY i kompleksa ESCRT nije ograničena samo na podjedinicu ESCRT-III. Ovi enzimi također reagiraju s podjedinicom ESCRT-0, vezujući se za domenu SH3 molekula STAM (36, 37). Opravdanost domene SH3 i vezivanje enzima koji vrše deubikvitinaciju u tako ranom stadiju razgradnje bjelančevina nije u potpunosti poznato, posebice kada se zna da je stalna ubikvitinacija nužna za pravilno usmjeravanje endocitotskog prometa. Moguće je da enzimi AMSH i UBPY imaju ulogu u kontroli receptora namijenjenih razgradnji u lizosomima ili recikliranja na staničnu površinu putem reciklirajućih endosoma, budući da se nalaze na početnom i završnom dijelu kompleksa ESCRT. Pokazano je kako utišavanje deubikvitinirajućih enzima AMSH i UBPY u stanici ima suprotan učinak na degradaciju EGF. Utišavanje AMSH dovodi do povećanja degradacije EGF, dok utišavanje UBPY dovodi do značajne inhibicije razgradnje EGF u uvjetima *in vitro* (108). Razlog ove proturječnosti, molekula naizgled vrlo slične uloge, nije u potpunosti jasan, kao što nije jasna potreba za domenom NLS u enzima koji je namijenjen deubikvitinaciji.

Postoji mogućnost da su vezna mjesta nekih bjelančevina kompleksa ESCRT selektivnija za neke bjelančevine, dok se druge bjelančevine moraju za njih natjecati. Budući da utišavanje AMSH dovodi do povećane degradacije receptora, moguć je veći afinitet ove bjelančevine za molekule STAM, dok vjerojatno veća selektivnost molekule UBPY za bjelančevine kompleksa ESCRT-III može dovesti do inhibicije razgradnje receptora ukoliko je ova bjelančevina utišana. Sličniji unutarstanični razmještaj molekula STAM2 i AMSH pokazan analizama u ovom radu potvrđuje moguću selektivnost molekule AMSH prema molekuli STAM2, te njihovu moguću ulogu u drugim staničnim odjeljcima.

Navedene činjenice ukazuju kako je molekularna mašinerija koja usmjeruje membranske bjelančevine u degradacijski signalni put trenutno vrlo aktualno znanstveno područje. Nizvodna regulacija signalizacije receptora osigurava slabljenje proliferacije i minimalizira stanični rast, a gubitak kontrole nizvodne regulacije dovodi do izrazitog rasta, što se povezuje s nastankom mnogih tumora.

## 6.2. STAM2 u živčanom sustavu miša

### 6.2.1. Izražaj gena *Stam2* poklapa se s izražajem stopljene bjelančevine STAM2- $\beta$ -galaktozidaza u živčanom sustavu

Izražaj gena *Stam2* određen je pomoću lokalizacije transkripta mRNA za gen *Stam2* u miša divljeg tipa postupkom hibridizacije RNA *in situ*, a smještaj bjelančevine STAM2 određen je pomoću protutijela specifičnog za STAM2. Kako bi dodatno provjerili izražaj i moguću ulogu gena *Stam2*, upotrijebljen je prethodno konstruiran mišji model koji nosi preinaku u genu *Stam2* dobivenu postupkom genske zamke. Sustavna analiza ovih miševa pokazala je kako je *Stam2* jako izražen u živčanom sustavu. Sve stanice u kojima je opažena  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost, također su pokazale i specifično STAM2 imunobojanje, što je potvrdilo kako izražaj gena *lacZ* na miševima preinačenim postupkom genske zamke odgovara stvarnom izražaju gena *Stam2*. Ovaj nalaz također pokazuje kako je transgenična mišja linija *Stam2*<sup>Gt1Gj</sup> prikladan i pouzdan model za istraživanje izražaja gena odnosno bjelančevine STAM2. Opažanje kako je  $\beta$ -galaktozidazna, odnosno STAM2 aktivnost ograničena samo na živčani sustav može se na prvi pogled činiti suprotnim od prethodno objavljenih rezultata dobivenih postupcima „northern blot“ i RT-PCR koji ukazuju na ubikvitaran izražaj *Stam2* (29, 79).

Prethodno ograničena  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost na heterozigotnim nosiocima mišje linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup> pokazana je na zamecima starim 11,5 dana u razvoju središnjeg živčanog sustava, što je i bio glavni razlog za odabir ove mišje linije za daljnja istraživanja (32, 109). Rezultati pokazani u ovom istraživanju razriješili su proturječnost između molekularnih analiza i izražaja *lacZ* transgena. Hibridizacija RNA *in situ* i imunohistokemija pokazale su dvije razine *Stam2* izražaja; niske i ubikvitarne naspram jake i specifične. Područja jakog signala dobivena postupcima hibridizacije RNA *in situ* i imunohistokemije preklapaju se s regijama  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti. Niža osjetljivost X-gal histokemije očekivana je zbog različitih razina detekcije triju uporabljenih metoda (mRNA, bjelančevine, te enzimске aktivnosti). Pokazano je kako X-gal histokemija ima nižu procijenjenu razinu genskog izražaja, dok imunohistokemija ima veću osjetljivost (110, 111). Nestabilnost mutirane bjelančevine može biti razlogom niže osjetljivost X-gal bojanja. Međutim, identificiranje regija s jačom razinom izražaja *Stam2* ne može se smatrati nedostatkom, budući da pokazuje područja koja su najrelevantnija za istraživanje uloge STAM2.

## 6.2.2. STAM2 u središnjem živčanom sustavu

### 6.2.2.1. Gen *Stam2* prisutan je u središnjem živčanom sustavu

Pretpostavka ovog rada bila je da će analiza regija visokog izražaja otkriti dosad, još uvijek nepoznatu ulogu STAM2, specifičnu za živčani sustav. Ovakav pristup zahtijevao je sustavnu analizu izražaja gena *Stam2*.

Iako je izražaj *Stam2* pronađen u svim regijama mozga, broj stanica koje izražavaju gen, odnosno koje posjeduju aktivnu bjelančevinu, vrlo je različit u različitim regijama mozga, što ukazuje na činjenicu kako je *Stam2* vjerojatno uključen u različite unutarstanične procese. Izražaj gena *Stam2* pronađen je u svim dijelovima mozga, a najintenzivniji je u području kore velikog mozga, posebice u 2. i 3. sloju, u hipokampusu, posebice u piramidalnim neuronima CA1 i CA2 regije, te u području gyrus fasciolaris, u granularnom sloju i sloju mitralnih stanica olfaktornog bulbusa, te u sloju Purkinjeovih stanica maloga mozga. Kada se uspoređuje s ostalim članovima kompleksa ESCRT-0, regije najintenzivnijeg izražaja *Stam2* poklapaju se s regijama izražaja *Stam1* i *Hrs*. Najjači izražaj *Stam1* mRNA uočen je u hipokampusu, kori velikog mozga, olfaktornim bulbusima, talamusu, kori maloga mozga, te u putamenu (112). Izražaj gena *Hrs* najintenzivniji je u hipokampusu, i to posebice u CA3 regiji, kori velikog mozga i hipotalamusu (113). Stoga je moguća uloga STAM2 u regijama najjačeg izražaja, koje se poklapaju s regijama izražaja ostalih bjelančevina ESCRT-0, u endocitozom-posredovanoj razgradnji bjelančevina.

Zanimljiva je i usporedba izražaja *Stam2* s molekulama AMSH i UBPY, deubikvitinirajućim enzimima koji se vezuju za molekulu STAM2. Najjači izražaj molekule *AmsH* pronađen je u kori velikog mozga, olfaktornim bulbusima, hipokampusu, posebice u CA1 regiji, te u malom mozgu (114), što se poklapa također s regijama najjačeg izražaja *Stam2*. Mnogo opširnija neuroanatomska analiza izražaja učinjena je sa sondama specifičnim za gen *UbpY*. Glasnička RNA *UbpY* najjače je izražena u CA1 regiji hipokampusa, dentatnom girusu, preoptičkim i periventrikularnim jezgrama diencefalona, u *substantii nigri*, ventralnom tegmentalnom području mezencefalona, te u granularnom sloju malog mozga (115). Veće preklapanje regija najjačeg izražaja molekula *Stam2* i *AmsH*, u odnosu na preklapanje izražaja molekula *Stam2* i *UbpY* na razini tkiva, govori u prilog mogućoj činjenici kako molekula AMSH više sudjeluje

u deubikvitinaciji bjelančevina u početnom dijelu kompleksa ESCRT, barem što se tiče središnjeg živčanog sustava.

Specifičan fenotip miševa kojima nedostaju STAM1, HRS i AMSH, što su sve redom molekule povezane sa STAM2, ukazuje na važnost bjelančevina koje međudjeluju s bjelančevinom STAM2 u živčanom sustavu. U svrhu istraživanja bjelančevina povezanih sa STAM2, proizvedeni su miševi s nul-mutacijama ovih gena. Onemogućavanje gena *Stam1* (engl. „*knock-out*“) dovodi do morfološkog zaostajanja u rastu dva tjedna nakon rođenja, a također je vidljiv abnormalan refleks podizanja stražnjih udova. Histološke su analize pokazale kako kod tih miševa dolazi do progresivnog odumiranja piramidalnih neurona u CA3 regiji hipokampusa nakon četiri tjedana života (112). Onemogućavanjem gena *Stam2* rađa se miš koji ne pokazuje znakove abnormalnosti, međutim onemogućavanje oba *Stam* gena je letalno (116). Smatra se kako, zbog vrlo slične uloge gena *Stam1* i *Stam2*, ukoliko je jedan od njih onemogućen, drugi gen može djelomično preuzeti njegovu ulogu. Kompenziranje uloge gena *Stam* sigurno postoji u embrionalnom razdoblju, ali u slučaju onemogućavanja gena *Stam1*, *Stam2* nije u mogućnosti preuzeti njegovu ulogu.

Analiza regija visokog, odnosno niskog izražaja gena *Stam1* i *Stam2* djelomično može objasniti nekompenziranje uloge u CA3 regiji hipokampusa. *Stam1* vrlo je intenzivno izražen u CA3 regiji hipokampusa, dok je u ovom radu pokazano kako je *Stam2* slabije izražen u CA3 regiji u odnosu na regije CA1 i CA2. Moguće je da zbog niže razine izražaja u CA3 regiji hipokampusa, *Stam2* nije u mogućnosti kompenzirati potpuni nedostatak gena *Stam1*.

Uvjetnim onemogućavanjem gena *Hrs* u miša, upotrebom *Hrs-Flox* mišjeg modela (pokusni model koji ne utječe na djelovanje gena tijekom embrionalnog razvitka, što se koristi u slučajevima kada konvencionalne nul-mutacijske metode rezultiraju embrionalnom letalnošću) ipak se uspio dobiti miš s mutacijom u genu *Hrs*. Fenotip takvog miša sličan je onom u miševa s nedostatkom gena *Stam1*, odnosno dolazi do zaostajanja u rastu od trećeg tjedna života na dalje. Histološke su analize pokazale odumiranje piramidalnih neurona u CA3 regiji hipokampusa nakon pet tjedana života, koje je uzrokovano nakupljanjem ubikvitina u piramidalnim neuronima. Na ovom mišjem modelu pokazano je nagomilavanje ubikvitiranih bjelančevina i u drugim regijama mozga, kao što je to korteks, a količina ubikvitiniranih bjelančevina rasla je sa starosti miševa. Testovima ponašanja pokazano je

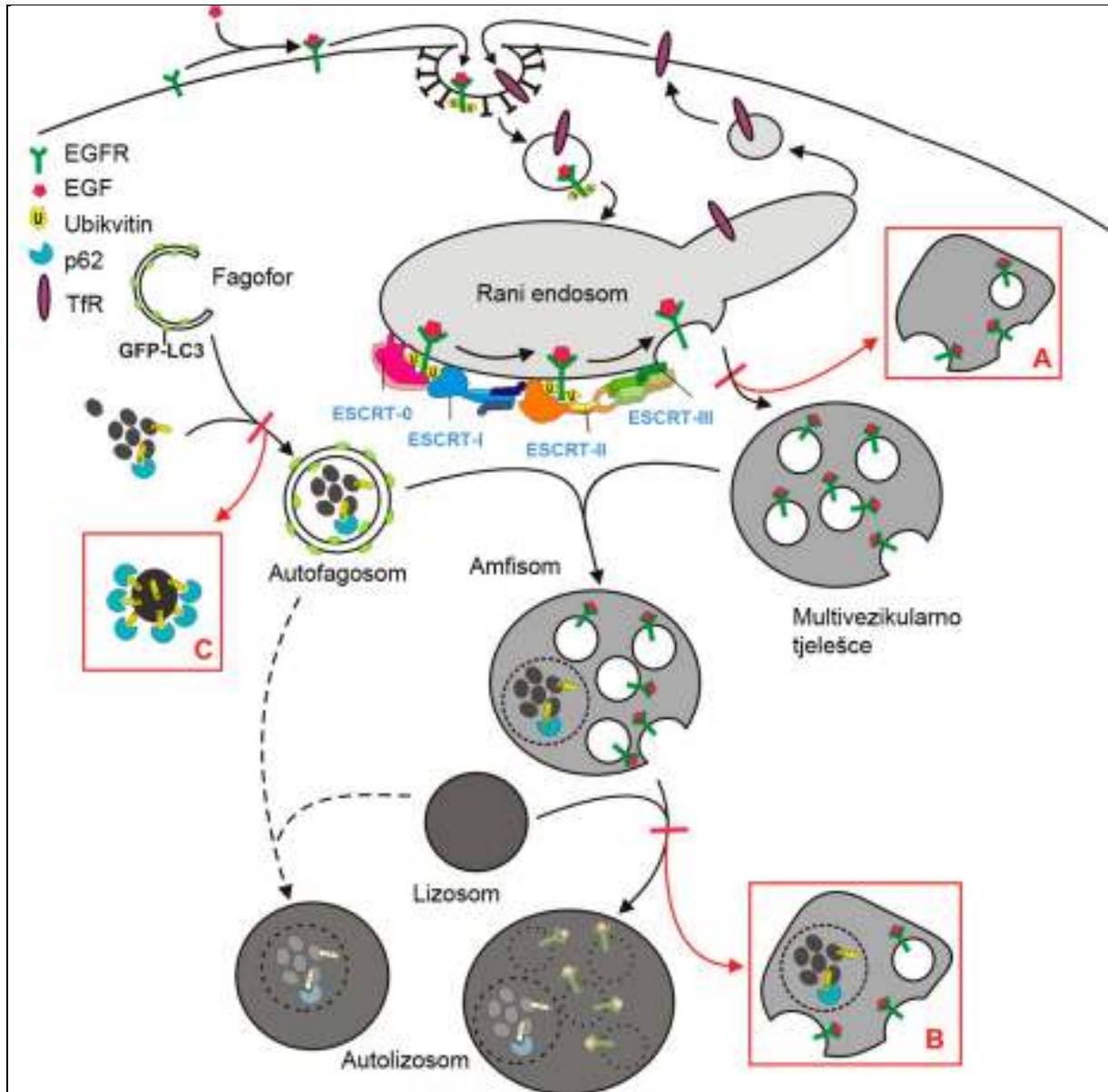
kako je sposobnost učenja kod takvih miševa bila umanjena u korelaciji s akumuliranjem ubikvitina (113), što ukazuje na moguću važnost bjelančevina ESCRT-0 u učenju i pamćenju.

Slična neurodegeneracija događa se i onemogućavanjem gena *Ams1*. U tom slučaju dolazi do odumiranja živčanih stanica u CA1 regiji hipokampusa (114).

Navedene činjenice ne začeđuju budući da najnovija istraživanja pokazuju kako bjelančevine kompleksa ESCRT, osim u procesu endocitoze i razgradnji unesenog sadržaja u lizosom, sudjeluju i u drugom načinu razgradnje, a to je proces autofagije. Autofagijom se razgrađuju dotrajali stanični dijelovi (npr. mitohondriji, peroksisomi). Autofagijom se najprije formira preautofagosomalna struktura, koja nastaje od izolirane membrane, a dozrijevanjem prelazi u fagofor. Kada se fagofor okruži dvoslojnom membranom nastaje autofagosom, koji je morfološki sličan multivezikularnom tjelešcu koje sudjeluje u procesu endocitoze. Autofagosom se u nekim slučajevima može spojiti s multivezikularnim tjelešcem, formirajući amfiosom, koji pritom posjeduje bjelančevine koje se razgrađuju procesom endocitoze i procesom autofagije. Autofagosom se može također povezati s lizosomom, pri čemu nastaje autolizosom, gdje se njegov sadržaj razgradi (68, 117) (slika 25). Do sada još nije poznato kako bjelančevine ESCRT odlučuju između spajanja lizosoma s multivezikularnim tjelešcem ili autofagosomom, ali je pronađeno kako obje ESCRT podjedinice, ESCRT0 i I, reagiraju s podjedinicom Vps18 kompleksa HOPS (engl. *homotypic fusion and vacuole protein sorting complex*; kompleks homotipnog spajanja i razvrstavanja bjelančevina u vakuoli) koja je potrebna za spajanje lizosoma s jednom ili drugom organelom (118). Da podjedinica ESCRT-0 kompleksa ESCRT sudjeluje u procesu autofagije, pokazano je na molekuli HRS. Pokazano je kako domena FYVE kojom se molekula HRS veže za membranu endosoma, također može vezati za membranu autofagosoma, a utišavanje molekule HRS dovodi do značajnog porasta broja autofagosoma u stanici, što znači da je proces autofagije nedjelotvoran (119). Budući da se molekula STAM2 veže za molekulu HRS, moguće je da i bjelančevina STAM2 sudjeluje u spomenutom procesu.

Niska razina autofagije u stanici ima neuroprotektivnu ulogu (120, 121), ali je pretjerana autofagija opasna. Autofagija ubikvitiranih citosolnih bjelančevina može se smatrati drugim mehanizmom kojim ubikvitin signalizira bjelančevinsku razgradnju u lizosomima. Još uvijek nije poznato razgrađuju li se autofagijom degradirane bjelančevine trenutno, ili dolazi do

opasnog nagomilavanja ubikvitiniranih bjelančevina koje mogu dovesti do neuodegeneracije stanica (122).



**Slika 25.** Shematski prikaz razgradnje bjelančevina u lizosomu procesom endocitoze i autofagije. Endocitozom se bjelančevine namjenjene razgradnji razvrstavaju u endosome i multivezikularna tjelešca. Autofagijom se bjelančevine razvrstavaju u fagofor, koji dozrijevanjem prelazi u autofagosom koji se tada spaja s lizosomom. U nekim slučajevima autofagosom se može spojiti s multivezikularnim tjelešcem, formirajući hibridnu strukturu - amfiosom, koja ima mogućnost spajanja s lizosomom (preuzeto i prilagođeno iz 68).

### **6.2.2.2. Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanim stanicama središnjeg živčanog sustava**

Budući da se pokazalo kako je *Stam2* najintenzivnije izražen u živčanom sustavu, bilo je potrebno odrediti stanice s vrlo jakim izražajem *Stam2*. Ispostavilo se da su ove stanice većinom živčane stanice.

Visoka razina *Stam2* izražaja pronađena je u svim živčanim stanicama. STAM2 imunobojanje pokazalo se u obliku točkastih struktura u tijelu živčanih stanica, te u njihovim nastavcima. U ovom radu je pokazano kako se točkaste strukture u citoplazmi dijelom poklapaju s biljegom ranih endosoma, te da je lokalizacija STAM2 u živčanim stanicama povezana i s ostalim članovima kompleksa ESCRT-0; STAM1 i HRS, kao što je to ranije pokazano na drugim tipovima stanica (35, 54). Visoka razina izražaja *Stam2* u živčanim stanicama ukazuje kako STAM2-povezana endosomska aktivnost može biti vrlo jaka u živčanim stanicama. Endosomi su uistinu organele koje sudjeluju u aktivnosti živčanih stanica, koja uključuje formaciju sinaptičkih vezikula, retrogradni aksonski transport, unutarstanični prijenos podražaja posredovan faktorima rasta, te razvrstavanje receptora i nizvodnu regulaciju (123). U usporedbi s ostalim staničnim tipovima, neuroni su posebice osjetljivi na oštećenja endosomsko-lizosomskog sustava, te je nenormalni endosomski promet povezan s mnogim neurodegenerativnim bolestima (62, 63, 64). U Huntingtonovoj bolesti povećanje poliglutamatnog lanca u huntingtinu uzrokuje odumiranje neurona u striatumu i korteksu (124). Za mutirani huntingtin vjeruje se kako dovodi do stanične smrti na nekoliko načina koji uključuju endosomsku disfunkciju, a huntingtin se u normalnim uvjetima veže za HIP1 (engl. *huntingtin interacting protein*; bjelančevina povezana s bjelančevinom huntingtin 1), bjelančevinom koja kolokalizira s bjelančevinom HRS na ranim endosomima (125). Mutacije u genu CHMP2B kompleksa ESCRT-III dovode do nakupljanja ubikvitin-pozitivnih bjelančevina, što ima za posljedicu pojavu frontotemporalne demencije i amiotrofične lateralne skleroze (65, 66). Nadalje, pokazano je kako bjelančevine ESCRT sudjeluju u uklanjanju TDP-43, glavnog ubikvitiniranog biljega u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi (68). Ova otkrića zajedno ukazuju na značaj kompleksa ESCRT za održavanje normalne homeostaze u živčanom sustavu.



### 6.2.3. STAM2 u perifernom živčanom sustavu

#### 6.2.3.1. Bjelančevina STAM2 izražena je u enteričkom živčanom sustavu

Izrazit izražaj *Stam2* pokazan je u mijenteričkom i submukoznom pleksusu enteričkog živčanog sustava cijelom duljinom probavne cijevi. Stanice koje su pokazale jak izražaj *Stam2* jesu enterički neuoni, dok je u stanicama enteričke glije vidljiv slab signal, kakav postoji ubikvitarno u svim stanicama.

Izražaj *Stam2* u enteričkim neuronima ne začuđuje, budući da je već rečeno kako je normalna aktivnost endosoma vrlo važna za funkciju živčanog sustava. Nadalje, u novim je istraživanjima pokazana korelacija između enteričkih neurona i onih središnjeg živčanog sustava. Homologija između obje vrste neurona (embriološka, morfološka, neurokemijska) pokazuje kako kod bolesti koje zahvaćaju središnji živčani sustav može doći i do disfunkcije enteričkih neurona. Ova činjenica je već dokumentirana u Parkinsonovoj bolesti (126, 127).

Prisutnost STAM2 i ostalih bjelančevina uključenih u kompleks ESCRT-0; STAM1 i HRS u enteričkom živčanom sustavu, daju dodatnu potvrdu kako se enterički neuroni mogu dovesti u vezu s onima koji su pogođeni neurodegenerativnim procesima u mozgu.

U perifernom živčanom sustavu, osim u enteričkim neuronima, jak *Stam2* izražaj pronađen je u nekim intersticijskim Cajalovim stanicama. U ovom je radu pokazano kako samo dio intersticijskih Cajalovih stanica, i to onih prisutnih u mijenteričkom pleksusu, kolokolazira sa STAM2 imunoreaktivnošću. Intersticijske Cajalove stanice specijalizirane su mezenhimske stanice u gastrointestinalnom traktu koje nisu niti neuroni niti glatke mišićne stanice. Moguća uloga ovih stanica je uloga pejsmejкера u intersticijskoj peristaltici tako da proizvode spontane, ritmičke, električke oscilacije u obliku tzv. „sporih valova“ (128). Između intersticijskih Cajalovih stanica i enteričkih živčanih nastavaka pokazani su sinaptički kontakti. Specifične subpopulacije enteričkih intersticijskih Cajalovih stanica uključene su u provedbu i pojačanje signala iz ekscitacijskih kolinergičkih i inhibicijskih nitrengičkih motoneurona (129, 130).

Prethodno je predloženo da STAM2 sudjeluje, ne samo u vezikularnom transportu endocitoze, već i u regulaciji procesa egzocitoze (131, 132). Za molekulu HRS je pokazano kako je

uvučena u proces otpuštanja neurotransmitera u neuronima, budući da se svojom domenom CC veže za SNAP-25 (engl. *synaptosomal-associated protein 25*; bjelančevina povezana sa sinaptosomima 25), bjelančevinu uključenu u otpuštanje i spajanje sinaptičkih mjehurića s presinaptičkom membranom, vežući se s membranskom integralnom bjelančevinom sintaksin, te bjelančevinom sinaptičkog mjehurića VAMP (engl. *vesicle-associated membrane protein 1*; membranska bjelančevina povezana s mjehurićima) (133, 134, 135). Budući da STAM2 djeluje u kompleksu s molekulom HRS, moguća je uloga STAM2 u sinapsi u stapanju presinaptičkih mjehurića s presinaptičkom membranom. Također je poznato kako intersticijske Cajalove stanice na svojoj površini sadrže raznolike receptore za enteričke neurotransmitere, a mnogi takvi receptori izraženi su u enteričkim neuronima (136). Iz ovog razloga nije iznenađujući izražaj *Stam2* kako u neuronima tako i u intescijskim Cajalovim stanicama.

#### **6.2.3.2. U transgeničnoj mišjoj liniji *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* nisu opažene fenotipske promjene**

Onemogućavanjem gena *Stam2* u transgeničnoj mišjoj liniji *Stam2<sup>Gt1Gaj</sup>* rađa se miš koji se morfološki ne razlikuje od ostalih miševa. Slični rezultati pokazani su u slučaju kompletnog onemogućavanja gena *Stam2* u homozigotnih mutanata dobivenih onemogućavanjem ciljanog gena (116).

Također, ne može se potvrditi je li visoka razina izražaja *Stam2* u enteričkom živčanom sustavu povezana sa specifičnom ulogom u pojedinim organima. Histokemijska i imunohistokemijska kvalitativna i kvantitativna ispitivanja homozigotnih miševa pokazala su normalnu morfologiju enteričkog živčanog sustava.

Vektor genske zamke ubačen je u gen *Stam2* između drugog i trećeg egzona, stoga se pretpostavlja kako zbog posljedica mutacije genskom zamkom nedostaje 86% normalne bjelančevine STAM2 sa C-terminalnog kraja (79). Bilo bi vrlo nevjerojatno kada bi odrezani dio bjelančevine koji sadrži svega 14% STAM2 mogao održati svoju funkciju. Dio mRNA koja se prepisuje u bjelančevinu sadrži samo regiju VHS, do sada još nepoznate uloge, a koja uz regiju UIM sudjeluje u vezanju ubikvitina i ubikvitiniranih bjelančevina. Sve ostale funkcionalne domene, redom: UIM, SH3, CC, SSM i ITAM nedostaju. Mogući razlog nedostatka fenotipskih promjena leži u činjenici kako mutacija genske zamke nije u

potpunosti poništila funkciju STAM2 zbog nepotpune učinkovitosti ubačenog primača prekrajanja, i na taj način omogućila prepisivanje normalne mRNA *Stam2* u bjelančevinu, unatoč mutaciji genske zamke. Međutim, najvjerojatnije objašnjenje čini se da leži u kompenzacijskoj ulozi gena *Stam1* i *Stam2*, odnosno na mogućoj činjenici da *Stam1* nadoknađuje ulogu *Stam2* u transgeničnoj mišjoj liniji s mutacijom u genu *Stam2*. Ova se činjenica može obrazložiti preklapanjem izražaja obje bjelančevine STAM koja je uočena na razini cijelog živčanog sustava.

### 6.3. STAM2 tijekom razvitka živčanog sustava miša

Analiza izražaja gena *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja pokazala je kako se *Stam2* pojavljuje u razvoju živčanog sustava u stadiju embrionalne starosti E11,5 gdje ostaje izražen do kraja embrionalnog razdoblja.

Endocitoza je važan proces u razvoju iz više razloga, iako je možda najvažniji uspostavljanje gradijenta morfogena kroz planarnu transcitozu, te njihov daljnji selektivni unos i degradacija. Potencijalne regije za ove procese odgovaraju regijama *Stam2* izražaja, a uključuju notokord, krovnu ploču i ploču dna neuralne cijevi, kortikalnu ploču telencefalona, te hipokampus.

Predloženo je također da STAM2 sudjeluje u egzotocoznom izbacivanju sekrecijskih granula (131, 132), stoga ne začuđuje jak izražaj *Stam2* u živčanom sustavu tijekom razvoja, kao i u endokrinom sustavu, kao što je primjerice hipofiza pri kraju gestacijskog razdoblja, koja je u ovom stadiju već jako sekrecijski aktivna.

*Stam2* je pokazao vrlo jak i specifičan izražaj u korteksu telencefalona. Pojavljivanje jakog *Stam2* izražaja u intermedijarnoj zoni u vrijeme diferencijacije i stratifikacije korteksa, te daljnje širenje izražaja na kortikalnu ploču tijekom intenzivne neuralne migracije i formacije kortikalnih slojeva, ukazuje na moguću ulogu *Stam2* u procesima kortikalne diferencijacije.

Kada se uspoređuje s ostalim članovima kompleksa ESCRT-0; *Hrs* i *Stam1*, uočeni izražaj *Stam2* je nešto ograničeniji no što je to izražaj gena *Hrs* u mišjim i štakorskim zamecima (137, 138, 139). Usporedba izražaja *Stam2* u ovom radu i već publicirane studije o izražaju *Stam1* (112) pokazuje kako se izražaj *Stam2* i *Stam1* mRNA poklapaju.

Onemogućavanjem gena *Stam2* rađa se miš koji se morfološki ne razlikuje od miševa divljeg tipa. Također, onemogućavanjem gena *Stam1* rađa se normalna životinja. Međutim, dvostruka nul-mutacija gena *Stam1* i *Stam2* letalna je u embrionalnom razdoblju. Takvi zameci umiru s 11,5 dana embrionalne starosti s poremećajem u ventralnom savijanju zametnog cilindra (116). Nalaz kako nedostatak obje bjelančevine STAM dovodi do letalnosti, naglašava važnost bjelančevina STAM još u embrionalnom razdoblju. Slično je dokazano i u uvjetima *in vitro*, gdje se pokušala napraviti dvostruka mutacija gena *Stam1* i *Stam2* na kulturi Hela stanica, upotrebom RNAi (engl. *RNA interference*; interferencija RNA) tehnologije čiji je cilj specifično utišavanje genske poruke, a time i stvaranje ciljne bjelančevine, upotrebom malih interferirajućih sljedova RNA. Takve stanice nisu uspjele preživjeti dvostruku mutaciju (43), što ukazuje na neophodnost gena *Stam* za osnovna stanična zbivanja. Pretpostavlja se da zbog vjerojatno vrlo slične uloge gena *Stam1* i *Stam2*, ukoliko je jedan od njih onemogućen, drugi gen ga može nadomjestiti i djelomično preuzeti njegovu ulogu (116). Druga podjedinica kompleksa ESCRT-0, bjelančevina HRS, također je nužna za preživljavanje zametaka. Nul-mutacija ovog gena je letalna, a zameci umiru nakon 10,5 dana embrionalnog razvitka pokazujući sličan poremećaj u ventralnom savijanju zametnog cilindra (138).

Rezultati ovog rada pokazuju dvije razine izražaja *Stam2*, nižu razinu izražaja detektiranu slabim signalom hibridizacije RNA *in situ* i imunohistokemije, te jaču razinu izražaja koja je bila jasno vidljiva pomoću svih triju metoda (hibridizacija RNA *in situ*, imunohistokemija i  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost). Ukoliko bi slično vrijedilo i za *Stam1*, mogli bi nagađati kako ove jače razine izražaja pomažu u kompenziranju uloge STAM1 ili STAM2 u slučaju njihovog individualnog gubitka, međutim u slučaju onemogućavanja oba gena, njihove uloge nije moguće nadomjestiti, što rezultira embrionalnom letalnošću.

Ovi rezultati zajedno ukazuju na važnost bjelančevine STAM2 u održavanju zdrave stanice.

## 7. ZAKLJUČCI

### 1. Gen *Stam2* izražen je u živčanom sustavu miša

Sustavna analiza odraslih miševa i zametaka divljeg tipa pokazala je kako je gen *Stam2* jako izražen u živčanom sustavu. Izražaj gena *Stam2* određen je pomoću lokalizacije transkripta mRNA za gen *Stam2* postupkom hibridizacije RNA *in situ*. Izražaj *Stam2* pronađen je u svim dijelovima mozga, a najintenzivniji je u području kore velikog mozga, hipokampusu, granularnom i sloju mitralnih stanica olfaktornog bulbusa, te u sloju Purkinjeovih stanica maloga mozga. Analiza *Stam2* tijekom embrionalnog razvoja pokazala je kako tijekom razvoja živčanog sustava izražaj započinje kod zametaka starih 11,5 dana, te traje do kraja embrionalnog razdoblja.

### 2. Bjelančevina STAM2 prisutna je u živčanom sustavu miša

Kako bi se istražila prisutnost bjelančevine STAM2 u živčanom sustavu, upotrijebljen je postupak imunohistokemije uporabom anti-STAM2 protutijela. Bjelančevina STAM2 prisutna je i u središnjem i u perifernom živčanom sustavu. Prisutnost bjelančevine STAM2 poklapa se s izražajem gena *Stam2*.

### 3. Izražaj stopljene bjelančevine STAM2- $\beta$ -galaktozidaza odgovara izražaju *Stam2* u živčanom sustavu transgenične mišje linije *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup>

Izražaj gena *lacZ*, odnosno bjelančevine  $\beta$ -galaktozidaza u transgeničnoj mišjoj liniji *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup> odgovara stvarnom izražaju gena *Stam2*. Sve stanice heterozigotnih nosioca mutacije u kojima je opažena  $\beta$ -galaktozidazna aktivnost, također su pokazale i specifično STAM2 imunobojanje. Ovaj nalaz također pokazuje kako je transgenična mišja linija *Stam2*<sup>Gt1Gaj</sup> prikladan i pouzdan model za istraživanje izražaja gena, odnosno bjelančevine STAM2.

#### **4. Bjelančevina STAM2 najjače je izražena u živčanim stanicama**

Većina *Stam2*-pozitivnih stanica središnjeg i perifernog živčanog sustava kolokalizira s biljezima živčanih stanica, što upućuje na činjenicu da su stanice koje izražavaju *Stam2* većinom živčane stanice. Bjelančevina STAM2 neznatno je prisutna u glija stanicama, kako središnjeg tako i perifernog živčanog sustava. Bjelančevina STAM2 prisutna je i u intersticijskim Cajalovim stanicama u enteričkom živčanom sustavu.

#### **5. Bjelančevina STAM2 smještena je unutar citoplazme i na endosomima živčanih stanica, kao dio kompleksa ESCRT-0**

Imunohistokemijske analize živčanih stanica pokazale su kako je bjelančevina STAM2 prisutna difuzno u citoplazmi u obliku točkastog signala. Točkasti signal djelomično kolokalizira s biljegom ranih endosoma, te s bjelančevinama STAM1 i HRS, što upućuje na djelovanje bjelančevine STAM2 u okviru kompleksa ESCRT-0 u živčanim stanicama.

#### **6. Bjelančevina STAM2 smještena je u jezgri živčanih stanica**

Imunobojanje specifičnim protutijelom STAM2 pokazalo je kako je, osim u točkastim strukturama unutar citoplazme, homogen i jak signal prisutan u jezgri živčanih stanica *in vivo* i *in vitro*. Ovaj nalaz upućuje na djelovanje molekule STAM2 u jezgri, a time i na moguću dvojaku ulogu STAM2 u različitim staničnim odjeljcima.

## 8. SAŽETAK

### **Izražaj gena *Stam2* u živčanom sustavu miša određen na razini mRNA, bjelančevine, te pomoću *lacZ* reporterskog sustava**

Katarina Kapuralin

Zagreb, 2012.

STAM2 dio je endosomskog kompleksa ESCRT-0, u kojem je uključen u razvrstavanje monoubikvitiniranih bjelančevina namijenjenih razgradnji u lizosomima. Budući da je STAM2 fosforiliran nakon vezanja čimbenika rasta i citokina za stanicu, sudjeluje u staničnoj signalizaciji, nalazeći se tako na križanju signalnih putova i membranskog transporta stanice.

Cilj ovog rada bio je određivanje izražaja *Stam2* u živčanom sustavu miša kako bi se dobio uvid u moguću ulogu toga gena u živčanom sustavu.

Kako bi se istražila molekula STAM2 učinjene su tehnike hibridizacije RNA *in situ* i imunobojanja. *Stam2* je izražen u centralnom i u perifernom živčanom sustavu. Potvrđeno je kako uzorak izražaja *Stam2* također može biti praćen histokemijskim određivanjem aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze u miševa koji nose preinaku u genu *Stam2*. Većina *Stam2*-pozitivnih stanica kolokalizira s biljezima živčanih stanica, što upućuje na činjenicu da su stanice koje izražavaju *Stam2* uglavnom živčane stanice. Osim u citosolnoj frakciji, značajna količina STAM2 prisutna je također i u frakciji jezgara, što upućuje na moguću dvojaku ulogu STAM2 u različitim staničnim odjeljcima.

Ovaj rad ukazuje kako smještaj STAM2 u živčanim stanicama omogućuje unutarstaničnu signalizaciju posredovanu endosomima, a time prisutnost u ključnim zbivanjima u djelovanju živčanog sustava.

## 9. SUMMARY

### ***Stam2* expression in the mouse nervous system at the mRNA and protein level and using *lacZ* reporter system**

Katarina Kapuralin

Zagreb, 2012.

STAM2 is a member of the endosome-associated complex ESCRT-0, and is involved in the sorting process of mono-ubiquitinated endosomal cargo for degradation in the lysosome. As STAM2 is phosphorylated upon binding diverse growth factors and cytokines to the cell membrane, it might also play a regulatory role in cell signalling, being at the intercross of signalling pathways and membrane transport in the cell.

The aim of this research was to determine *Stam2* expression in mouse nervous system in order to get insight into its possible role.

In order to investigate *Stam2* molecule, *in situ* RNA hybridization and immunostaining were performed. *Stam2* is expressed in the central and peripheral nervous system. It was confirmed that expression pattern of *Stam2* can be assessed by histochemical detection of beta-galactosidase activity in a mouse carrying a gene trap modification of *Stam2* gene as well. The majority of *Stam2*-positive cells co-stained with the neuronal markers, indicating that *Stam2*-expressing cells are largely neurons. Apart in the cytosolic fraction, significant amount of STAM2 is present in the nuclear fraction as well, indicating possible dual role of STAM2 in the different subcellular compartments.

This work indicates that localization of STAM2 enables endosome mediated intracellular signaling in neurons and hence involvement in the crucial events in the nervous system.



## 10. POPIS LITERATURE

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribosnucleic acid. *Nature* 1953;171(4356):737-8.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-51.
3. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A et al. A physical map of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):934-41.
4. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431(7011):931-45.
5. James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys* 1997;30(4):279-331.
6. Geisow MJ. Proteomics: one small step for a digital computer, one giant leap for humankind. *Nat Biotechnol* 1998;16(2):206.
7. Müllner S, Neumann T, Lottspeich F. Proteomics--a new way for drug target discovery. *Arzneimittelforschung* 1998;48(1):93-5.
8. Chakravarti B, Mallik B, Chakravarti DN. Proteomics and systems biology: application in drug discovery and development. *Methods Mol Biol* 2010;662:3-28.
9. Mullighan C, Petersdorf E, Davies SM, DiPersio J. From trees to the forest: genes to genomics. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(1 Suppl):S52-7.
10. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 1970;227(5258):561-3.
11. Tamarin RH. Principles of genetics. 6th edition. WCB/McGraw-Hill 1999.
12. Byrne JH, Roberts JL. From molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience. Elsevier Science 2004.
13. Stryer L. Biokemija. Školska knjiga 1991.

14. Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(7):473-83.
15. Cooper GM. *The Cell. A molecular approach*. 2nd edition. ASM Press 2000.
16. Berggård T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 2007;7(16):2833-42.
17. Yang XJ. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 2005;24(10):1653-62.
18. Clague MJ, Urbé S. The interface of receptor trafficking and signalling. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 17):3075-81.
19. Marmor MD, Yarden Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 2004;23(11):2057-70.
20. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* 2000;100(1):113-27.
21. Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV, Laue ED. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 2002;416(6876):103-7.
22. Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin S. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 2008;90(2):306-12.
23. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-79.
24. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(3):169-78.
25. 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(5):461-6.
26. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 2005;24(19):3353-9.

27. Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8(6):610-6.
28. Kirkin V, Dikic I. Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(2):199-205.
29. 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(1):57-69.
30. Endo K, Takeshita T, Kasai H, Sasaki Y, Tanaka N, Asao H, Kikuchi K, Yamada M, Chenb M, O'Shea JJ, Sugamura K. STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases. *FEBS Lett* 2000;477(1-2):55-61.
31. Pandey A, Fernandez MM, Steen H, Blagoev B, Nielsen MM, Roche S, Mann M, Lodish HF. 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(49):38633-9.
32. Ćurlin M, Kostović-Knežević LJ, Gajović S. Gene trap mutagenesis of three genes expressed during mouse embryo development. *Period Biol* 2002;104(1):47-54.
33. 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(9):3675-89.
34. 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* 2004;135(3):385-96.
35. Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, Stenmark H. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278(14):12513-21.

36. Tanaka N, Kaneko K, Asao H, Kasai H, Endo Y, Fujita T, Takeshita T, Sugamura K. Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem* 1999;274(27):19129-35.
37. 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(48):37481-7.
38. Ren J, Kee Y, Huibregtse JM, Piper RC. Hse1, a component of the yeast Hrs-STAM ubiquitin-sorting complex, associates with ubiquitin peptidases and a ligase to control sorting efficiency into multivesicular bodies. *Mol Biol Cell* 2007;18(1):324-35.
39. Ren J, Pashkova N, Winistorfer S, Piper RC. DOA1/UFD3 plays a role in sorting ubiquitinated membrane proteins into multivesicular bodies. *J Biol Chem* 2008;283(31):21599-611.
40. Kong C, Su X, Chen PI, Stahl PD. Rin1 interacts with signal-transducing adaptor molecule (STAM) and mediates epidermal growth factor receptor trafficking and degradation. *J Biol Chem* 2007;282(20):15294-301.
41. Lohi O, Lehto VP. STAM/EAST/Hbp adapter proteins--integrators of signalling pathways. *FEBS Lett* 2001;508(3):287-90.
42. Morvan J, Froissard M, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D. The ubiquitin ligase Rsp5p is required for modification and sorting of membrane proteins into multivesicular bodies. *Traffic* 2004;5(5):383-92.
43. Rismanchi N, Puertollano R, Blackstone C. STAM adaptor proteins interact with COPII complexes and function in ER-to-Golgi trafficking. *Traffic* 2009;10(2):201-17.
44. Roxrud I, Stenmark H, Malerød L. ESCRT & Co. *Biol Cell* 2010;102(5):293-318.
45. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997;278(5346):2075-80.
46. Cooper GM, Hausman RE. Stanica – molekularni pristup. Medicinska naklada, Zagreb. 2004.

47. Raiborg C, Rusten TE, Stenmark H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(4):446-55.
48. Katzman DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(12):893-905.
49. 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(2):145-55.
50. Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 2003;162(3):413-23.
51. Conibear E. An ESCRT into the endosome. *Mol Cell* 2002;10(2):215-6.
52. Hurley JH, Emr SD. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2006;35:277-98.
53. Williams RL, Urbé S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(5):355-68.
54. Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* 2002;4(7):534-9.
55. Leung KF, Dacks JB, Field MC. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic* 2008;9(10):1698-716.
56. Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 1998;394(6692):432-3.
57. Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 12):2255-63.
58. Roxrud I, Raiborg C, Pedersen NM, Stang E, Stenmark H. An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 2008;180(6):1205-18.

59. Hirano S, Kawasaki M, Ura H, Kato R, Raiborg C, Stenmark H, Wakatsuki S. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13(3):272-7.
60. Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol* 2003;162(3):435-42.
61. Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol* 2003;162(3):425-34.
62. Stuffers S, Brech A, Stenmark H. ESCRT proteins in physiology and disease. *Exp Cell Res* 2009;315(9):1619-26.
63. Saksena S, Emr SD. ESCRTs and human disease. *Biochem Soc Trans* 2009;37(Pt 1):167-72.
64. Hurley JH. The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45(6):463-87.
65. Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM; MRC Proteomics in ALS Study; FReJA Consortium. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (Charged multivesicular body protein 2B). *Neurology* 2006;67(6):1074-7.
66. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 2005;37(8):806-8.
67. Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LM, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, Wendler F, Vincent JP, Brech A, Bilder D, Stenmark H. ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* 2007;17(20):1817-25.
68. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A. Functional multivesicular bodies are required for

- autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* 2007;179(3):485-500.
69. Silva J, Chang K, Hannon GJ, Rivas FV. RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* 2004;23(51):8401-9.
  70. Brown SD, Nolan PM. Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Hum Mol Genet* 1998;7(10):1627-33.
  71. Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, Duyk G, Dymecki S, Eppig JT, Grieder FB, Heintz N, Hicks G, Insel TR, Joyner A, Koller BH, Lloyd KC, Magnuson T, Moore MW, Nagy A, Pollock JD, Roses AD, Sands AT, Seed B, Skarnes WC, Snoddy J, Soriano P, Stewart DJ, Stewart F, Stillman B, Varmus H, Varticovski L, Verma IM, Vogt TF, von Melchner H, Witkowski J, Woychik RP, Wurst W, Yancopoulos GD, Young SG, Zambrowicz B. The knockout mouse project. *Nat Genet* 2004;36(9):921-4.
  72. Hampton T. Knockout science: massive mouse project to provide window into human diseases. *JAMA* 2011;306(18):1968.
  73. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther* 2004;11 Suppl 1:S64-6.
  74. Brown SD, Nolan PM. Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Hum Mol Genet* 1998;7(10):1627-33.
  75. Anderson KV, Ingham PW. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:285-93.
  76. Mortlock DP. Comparative bioinformatics for mouse and human genes: getting started. *Curr Protoc Hum Genet* 2004;Chapter 1:Unit 1.10.
  77. Skarnes WC, Auerbach BA, Joyner AL. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the *lacZ* reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev* 1992;6(6):903-918.

78. 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(6):395–404.
79. Ćurlin M, Lucić V, Gajović 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(1):16–24.
80. [http://dels-old.nas.edu/ilar\\_n/ilarhome/](http://dels-old.nas.edu/ilar_n/ilarhome/)
81. Kanazawa C, Morita E, Yamada M, Ishii N, Miura S, Asao H, Yoshimori T, Sugamura K. Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(4):848-56.
82. Theiler K. *The house mouse: development and normal stages from fertilization to four weeks of age*. Springer-Verlag, Berlin 1989.
83. Van Ginneken C, Van Meir F, Weyns A. Stereologic characteristics of pig small intestine during normal development. *Dig Dis Sci* 2002;47(4):868-78.
84. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147(Pt 3):229-63.
85. Bernocco S, Fondelli C, Matteoni S, Magnoni L, Gotta S, Terstappen GC, Raggiaschi R. Sequential detergent fractionation of primary neurons for proteomics studies. *Proteomics* 2008;8(5):930-8.
86. Komuro T, Tokui K, Zhou DS. Identification of the interstitial cells of Cajal. *Histol Histopathol* 1996;11:769–786.
87. Eyer J, Peterson A. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 1994;12(2):389-405.
88. Letournel F, Bocquet A, Perrot R, Dechaume A, Guinut F, Eyer J, Barthelaix A. Neurofilament high molecular weight-green fluorescent protein fusion is normally expressed in neurons and transported in axons: a neuronal marker to investigate the biology of neurofilaments. *Neuroscience* 2006;137(1):103-11.



89. McCullough J, Row PE, Lorenzo O, Doherty M, Beynon R, Clague MJ, Urbé S. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol* 2006;16(2):160-5.
90. Kantamneni S, Holman D, Wilkinson KA, Corrêa SA, Feligioni M, Ogden S, Fraser W, Nishimune A, Henley JM. GISP binding to TSG101 increases GABA receptor stability by down-regulating ESCRT-mediated lysosomal degradation. *J Neurochem* 2008;107(1):86-95.
91. Kantamneni S, Holman D, Wilkinson KA, Nishimune A, Henley JM. GISP increases neurotransmitter receptor stability by down-regulating ESCRT-mediated lysosomal degradation. *Neurosci Lett* 2009;452(2):106-10.
92. Burz DS, Shekhtman A. In-cell biochemistry using NMR spectroscopy. *PLoS One* 2008;3(7):e2571.
93. Row PE, Clague MJ, Urbé 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(Pt 3):629-36.
94. Abella JV, Peschard P, Naujokas MA, Lin T, Saucier C, Urbé S, Park M. Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2005;25(21):9632-45.
95. Mui AL, Wakao H, Kinoshita T, Kitamura T, Miyajima A. Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J* 1996;15(10):2425-33.
96. Stauffer DR, Howard TL, Nyun T, Hollenberg SM. CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 13):2383-93.
97. Whitley P, Reaves BJ, Hashimoto M, Riley AM, Potter BV, Holman GD. Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization. *J Biol Chem* 2003;278(40):38786-95.

98. Hittelman AB, Burakov D, Iñiguez-Lluhí JA, Freedman LP, Garabedian MJ. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 1999;18(19):5380-8.
99. Vecchi M, Polo S, Poupon V, van de Loo JW, Benmerah A, Di Fiore PP. Nucleocytoplasmic shuttling of endocytic proteins. *J Cell Biol* 2001;153(7):1511-7.
100. Hyman J, Chen H, Di Fiore PP, De Camilli P, Brunger AT. Epsin 1 undergoes nucleocytosolic shuttling and its eps15 interactor NH(2)-terminal homology (ENTH) domain, structurally similar to Armadillo and HEAT repeats, interacts with the transcription factor promyelocytic leukemia Zn(2)+ finger protein (PLZF). *J Cell Biol* 2000;149(3):537-46.
101. Poupon V, Polo S, Vecchi M, Martin G, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N, Di Fiore PP, Benmerah A. Differential nucleocytoplasmic trafficking between the related endocytic proteins Eps15 and Eps15R. *J Biol Chem* 2002;277(11):8941-8.
102. Scott MG, Le Rouzic E, Périanin A, Pierotti V, Enslin H, Benichou S, Marullo S, Benmerah A. Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J Biol Chem* 2002;277(40):37693-701.
103. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 2004;116(3):445-56.
104. Kikuchi K, Ishii N, Asao H, Sugamura K. Identification of AMSH-LP containing a Jab1/MPN domain metalloenzyme motif. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306(3):637-43.
105. Newmeyer DD, Forbes DJ. Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* 1988;52(5):641-53.
106. Agromayor M, Martin-Serrano J. Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J Biol Chem* 2006;281(32):23083-91.

107. Row PE, Liu H, Hayes S, Welchman R, Charalabous P, Hofmann K, Clague MJ, Sanderson CM, Urbé S. The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem* 2007;282(42):30929-37.
108. Bowers K, Piper SC, Edeling MA, Gray SR, Owen DJ, Lehner PJ, Luzio JP. Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. *J Biol Chem* 2006;281(8):5094-105.
109. Gajović 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(1):138-43.
110. Pereira C, Maamar-Tayeb M, Burke A, Perez-Polo R, Herndon DN, Jeschke MG. Immunohistochemical staining of transgenic beta-galactosidase in burned skin is a better indicator of transfection efficiency than histochemical techniques. *J Immunol Methods* 2006;315(1-2):75-9.
111. Couégnas A, Schweitzer A, Andrieux A, Ghandour MS, Boehm N. Expression pattern of STOP lacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. *J Neurosci Res* 2007;85(7):1515-27.
112. Yamada M, Takeshita T, Miura S, Murata K, Kimura Y, Ishii N, Nose M, Sakagami H, Kondo H, Tashiro F, Miyazaki JI, Sasaki H, Sugamura K. Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol Cell Biol* 2001;21(11):3807-19.
113. Tamai K, Toyoshima M, Tanaka N, Yamamoto N, Owada Y, Kiyonari H, Murata K, Ueno Y, Ono M, Shimosegawa T, Yaegashi N, Watanabe M, Sugamura K. Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. *Am J Pathol* 2008;173(6):1806-17.
114. Ishii N, Owada Y, Yamada M, Miura S, Murata K, Asao H, Kondo H, Sugamura K. Loss of neurons in the hippocampus and cerebral cortex of AMSH-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2001;21(24):8626-37.

115. Bruzzone F, Vallarino M, Berruti G, Angelini C. Expression of the deubiquitinating enzyme mUBPy in the mouse brain. *Brain Res* 2008;1195:56-66.
116. Yamada M, Ishii N, Asao H, Murata K, Kanazawa C, Sasaki H, Sugamura K. Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol Cell Biol* 2002;22(24):8648-58.
117. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(7):458-67.
118. Kim BY, Akazawa C. Endosomal trafficking of EGFR regulated by hVps18 via interaction of MVB sorting machinery. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362(3):612-618.
119. Tamai K, Tanaka N, Nara A, Yamamoto A, Nakagawa I, Yoshimori T, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;360(4):721-7.
120. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006;441(7095):880-4.
121. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004;36(6):585-95.
122. Nixon RA, Cataldo AM. Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006;9(3 Suppl):277-89.
123. Vance JE, Campenot RB, Vance DE. The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486(1):84-96.
124. Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57(5):369-84.

125. Metzler M, Li B, Gan L, Georgiou J, Gutekunst CA, Wang Y, Torre E, Devon RS, Oh R, Legendre-Guillemain V, Rich M, Alvarez C, Gertsenstein M, McPherson PS, Nagy A, Wang YT, Roder JC, Raymond LA, Hayden MR. Disruption of the endocytic protein HIP1 results in neurological deficits and decreased AMPA receptor trafficking. *EMBO J* 2003;22(13):3254-66.
126. Kuo YM, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani AK, Orrison BM, Bruneau BG, Giasson BI, Smeyne RJ, Gershon MD, Nussbaum RL. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet* 2010;19(9):1633-50.
127. Lebouvier T, Chaumette T, Paillusson S, Duyckaerts C, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P. The second brain and Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2009;30(5):735-41.
128. Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994;480 ( Pt 1):91-7.
129. Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 1998;115(2):314-29.
130. Iino S, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal are functionally innervated by excitatory motor neurones in the murine intestine. *J Physiol* 2004;556(Pt 2):521-30.
131. 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(3):752-6.
132. Komada M, Kitamura N. Hrs and hbp: possible regulators of endocytosis and exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281(5):1065-9.
133. Bean AJ, Seifert R, Chen YA, Sacks R, Scheller RH. Hrs-2 is an ATPase implicated in calcium-regulated secretion. *Nature* 1997;385(6619):826-9.

134. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993;362(6418):318-24.
135. Kwong J, Roundabush FL, Hutton Moore P, Montague M, Oldham W, Li Y, Chin LS, Li L. Hrs interacts with SNAP-25 and regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 12):2273-84.
136. Beckett EA, Takeda Y, Yanase H, Sanders KM, Ward SM. Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol* 2005;493(2):193-206.
137. Avantiaggiato 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(6):1191-8.
138. 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(11):1475-85.
139. Tsujimoto S, Peltto-Huikko M, Aitola M, Meister B, Vik-Mo EO, Davanger S, Scheller RH, Bean AJ. The cellular and developmental expression of hrs-2 in rat. *Eur J Neurosci* 1999;11(9):3047-63.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 05.07.1983. godine u Puli gdje sam završila osnovnu školu, te srednju, prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2002. godine. Diplomirala sam 2007. godine diplomskim radom pod naslovom: „Procjena mutagenih učinaka strukturno srodnih flavonoida u uvjetima *in vitro*“. Tijekom studija primala sam državnu stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa “A“ kategorije - za osobito nadarene studente. Od 2008. godine zaposlena sam na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao znanstveni novak-asistent, gdje sudjelujem na projektima prof.dr.sc. S. Gajovića „Uloga gena u diferencijaciji i plastičnosti središnjeg živčanog sustava miša“, dodijeljenog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, te „Regeneracija i plastičnost nakon ishemijske ozljede mozga istraživana na inovativnim transgeničnim mišjim modelima“, dodijeljenog od Fonda Jedinstvo uz pomoć znanja, UKF. Područja mog istraživanja jesu neurogenetika i stanična signalizacija. Autorica sam 3 znanstvena rada indeksirana u CC bazi, te 15 kongresnih sažetaka. Sudjelujem u nastavi iz predmeta „Histologija i embriologija“ za studente dodiplomske nastave Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na hrvatskom i engleskom jeziku. Redovna sam članica Hrvatskog društva za neurozanost, te Hrvatskog mikroskopijskog društva.