

# Obrazac ekspresije proteina HuD u prenatalnoj moždanoj kori čovjeka

---

Vukoja, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:625801>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

Iva Vukoja

1342/MB

**OBRAZAC EKSPRESIJE PROTEINA  
HUD U PRENATALNOJ MOŽDANOJ  
KORI ČOVJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurogenomiku i *in situ* hibridizaciju na Zavodu za neuroznanost pri Hrvatskom institutu za istraživanje mozga na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Željke Krsnik te uz pomoć mentora izv. prof. dr. sc. Rene Hrašćana iz Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama sa Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem izv. prof. dr. sc. Željki Krsnik na pružanju mogućnosti rada u njenom laboratoriju, izuzetnoj stručnoj i ljudskoj pomoći, savjetima i srdačnosti koji su mi itekako olakšali izradu i pisanje diplomskog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Reni Hrašćanu na uloženom vremenu i povjerenju za suvođenje diplomskog rada.

Zahvaljujem se Tereziji Miškić i Janji Kopic s Hrvatskog instituta za istraživanje mozga na iznimnoj pomoći, stručnim savjetima te dobroj atmosferi u laboratoriju prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim mojim kolegama i bliskim prijateljima na podršci i bodrenju tijekom cijelog mog studiranja.

I na kraju, jedno posebno hvala želim reći svome djedu Mati, roditeljima, bratu i sestri. Hvala Vam za bezuvjetnu ljubav i podršku tijekom cijelog mog studiranja. Bez Vas ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Veliko HVALA svima!

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Hrvatski institut za istraživanje mozga  
Zavod za neuroznanost  
Laboratorij za neurogenomiku i *in situ* hibridizaciju

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### OBRAZAC EKSPRESIJE PROTEINA HUD U PRENATALNOJ MOŽDANOJ KORI ČOVJEKA

*Iva Vukoja, 1342/MB*

**Sažetak:** *Moždana kora čovjeka je odgovorna za percepciju osjetila, motoriku, emocije, te više kognitivne funkcije, poput razmišljanja, govora, pamćenja, itd. Razvoj moždane kore obuhvaća složene histogenetske procese kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija neurona, te sinaptogeneza. Stoga prenatalni razvoj moždane kore obuhvaća nastanak privremenih fetalnih zona u stijenci fetalnog telencefalona: ventrikularna zona, subventrikularna zona, intermedijalna zona, subplate zona, kortikalna ploča i marginalna zona. Pravilan razvoj moždane kore uključuje strogo kontrolirane transkripcijske i post-transkripcijske mehanizme, pri čemu je važnu ulogu pokazao RNA-vezujući protein HuD. Iako je mehanizam djelovanja prethodno proučavan, obrazac ekspresije ovog RNA-vezujućeg proteina u svim privremeno fetalnim zonama ostaje nepoznat. Koristeći metode *in situ* hibridizacije u ovom diplomskom radu, pokazali smo obrazac ekspresije ELAVL4 mRNA između 10. i 21. tjedna nakon začeća u svim fetalnim zonama. Metoda imunofluorescencije je dala uvid u obrazac ekspresije proteina HuD, koji se pokazao najintenzivnije eksprimiranim u subventrikularnoj zoni i kortikalnoj ploči tijekom ranog fetalnog razdoblja, dok je tijekom srednje fetalnog razdoblja došlo do smanjenja ekspresije u svim zonama, osim u kortikalnoj ploči. Rezultati su pokazali dinamičnost u obrascu ekspresije ELAVL4 mRNA, te usporedbom s obrascem ekspresije proteina HuD dovode do zaključka da je translacija ELAVL4 mRNA strogo regulirana tijekom razvoja moždane kore.*

**Ključne riječi:** moždana kora, fetalne zone, RNA-vezujući protein HuD, *in situ* hibridizacija, imunofluorescencija

**Rad sadrži:** 45 stranica, 11 slika, 1 tablica, 40 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Reno Hrašćan*, viši znanstveni suradnik

**Pomoć pri izradi:** izv. prof. dr. sc. *Željka Krsnik*, viša znanstvena suradnica

#### **Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. *Kristina Radošević*
2. Izv. prof. dr. sc. *Reno Hrašćan*
3. Izv. prof. dr. sc. *Željka Krsnik*
4. Doc. dr. sc. *Tomislav Vladušić* (zamjena)

**Datum obrane:** 23.9.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Croatian institute for brain research  
Department of neuroscience  
Laboratory for neurogenomics and *in situ* hybridization

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### EXPRESSION PATTERN OF THE HUD PROTEIN IN THE CEREBRAL CORTEX DURING HUMAN PRENATAL DEVELOPMENT

Iva Vukoja, 1342/MB

**Abstract:** Human cerebral cortex is responsible for sensory perception, voluntary movement, emotions, cognitive functions such as thinking, speech, memory, etc. Development of cerebral cortex includes complex histogenetic events such as proliferation, differentiation, neuronal migration and synaptogenesis. Therefore, prenatal development of the cerebral cortex includes formation of temporary fetal zones: ventricular zone, subventricular zone, intermediate zone, subplate zone, cortical plate and marginal zone. To develop properly, the cerebral cortex is regulated by post-transcriptional mechanisms of which important role has RNA binding protein HuD. Even though important HuD molecular interactions and mechanism have been previously studied, its expression pattern in fetal zones remains unknown. Here, using *in situ* hybridization method, we showed expression pattern of ELAVL4 mRNA between 10 and 21 post conceptual week throughout all fetal zones. Utilizing immunofluorescence, gave us an insight in expression pattern of the HuD protein, that showed highest expression in subventricular zone and cortical plate during early fetal period, while expression pattern during mid fetal period was reduced throughout cerebral wall except in cortical plate. Therefore, our results showed a dynamic expression pattern of ELAVL4 mRNA. Comparison with the expression pattern of HuD protein leads to conclusion that ELAVL4 mRNA translation is strictly regulated during proper development of cerebral cortex.

**Keywords:** cerebral cortex, fetal zones, RNA binding protein HuD, *in situ* hybridization, immunofluorescence

**Thesis contains:** 45 pages, 11 figures, 1 table, 40 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. Reno Hrašćan, Associate professor

**Technical support and assistance:** PhD. Željka Krsnik, Associate professor

#### Reviewers:

1. PhD. Kristina Radošević, Associate professor
2. PhD. Reno Hrašćan, Associate professor
3. PhD. Željka Krsnik, Associate professor
4. PhD. Tomislav Vladušić, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 23<sup>th</sup> September 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Osnovna podjela i organizacija središnjeg živčanog sustava .....	3
2.2. Građa i raznolikost živčanih stanica središnjeg živčanog sustava.....	3
2.2.1. Neuron.....	3
2.2.2. Glija stanice.....	4
2.3. Razvoj moždane kore tijekom prenatalnog razdoblja čovjeka .....	5
2.3.1. Histogenetski procesi i privremene fetalne zone.....	5
2.3.2. Programirana stanična smrt u središnjem živčanom sustavu .....	10
2.4. Struktura moždane kore odraslog čovjeka.....	10
2.5. Uloga i post-transkripcijski mehanizmi djelovanja RNA-vezujućih proteina bitnih za razvoj moždane kore .....	13
2.6. Važnost <i>ELAVL4</i> gena tijekom razvoja moždane kore .....	16
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	19
3.1. MATERIJALI.....	19
3.1.1. Postmortalni uzorci fetalnog moždanog tkiva čovjeka .....	19
3.1.2. Korištene otopine i pribor u laboratoriju za <i>in situ</i> hibridizaciju .....	20
3.1.3. Korištena proba za <i>in situ</i> hibridizaciju.....	20
3.1.4. Korišteno protutijelo za detekciju probe metodom <i>in situ</i> hibridizacije .....	20
3.1.5. Korišteni supstrati za <i>in situ</i> hibridizaciju .....	20
3.1.6. Laboratorijski pribor i otopine za imunofluorescenciju .....	20
3.1.7. Primarna protutijela korištena za imunofluorescenciju.....	21
3.1.8. Sekundarna protutijela korištena za imunofluorescenciju.....	21
3.1.9. Uređaj korišten za analizu histoloških rezova.....	21
3.2. METODE .....	21
3.2.1. <i>In situ</i> hibridizacija (ISH) na moždanom tkivu čovjeka.....	21
3.2.2. Imunofluorescencija (IF) na moždanom tkivu čovjeka.....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	26
4.1. Analiza <i>in situ</i> hibridizacije <i>ELAVL4</i> produkta tijekom prenatalnog razvoja moždane kore čovjeka .....	26
4.2. Imunofluorescencijska analiza proteina HuD tijekom prenatalnog razvoja moždane kore čovjeka .....	32
4.3. Obrazac ekspresije <i>ELAVL4</i> mRNA i <i>ELAVL4</i> tijekom prenatalnog razvoja moždane kore .....	36



<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	38
<b>6. LITERATURA</b> .....	39
<b>7. PRILOZI</b> .....	43

# 1. UVOD

Moždana kora predstavlja koru velikog mozga (cerebruma) koja obavlja moždane hemisfere sastavljenu od kompleksno organiziranog živčanog tkiva, te je odgovorna za osjetne, motoričke, emocionalne, te više kognitivne funkcije čovjeka. Najveći dio moždane kore čini neokorteks, nastao formiranjem šest slojeva tijekom prenatalnog razvoja mozga, te se filogenetski smatra najnovijim dijelom moždane kore i predstavlja ključnu značajku u evoluciji sisavaca. Kako bi neokorteks bio sposoban obavljati složene kognitivne i motoričke zadatke, niz genetičkih i molekularnih mehanizama treba točno kontrolirati rađanje, poziciju i identitet neurona te stvoriti njihove precizne sinaptičke veze tijekom prenatalnog razvoja. Neokorteks se sastoji od šest horizontalnih slojeva koji su citoarhitektonski i funkcionalno različiti. Svaki sloj sadrži jedinstvenu skupinu neurona, uključujući glutamatergičke ekscitacijske piramidne neurone i GABAergičke inhibicijske neurone, interneurone (Rubenstein, 2011).

Sama složenost neokorteksa se javlja već tijekom njegova prenatalnog razvoja u kojem se formiraju privremene fetalne zone kojih nema postnatalno. Stijenka fetalnog telencefalona sastoji se od šest privremenih fetalnih zona: VZ: ventrikularne zone, SVZ: subventrikularne zone, IZ: intermedijalne zone, SP: subplate zone, KP: kortikalne ploče i MZ: marginalne zone, nastale u različitom vremenskom periodu iz kojih će se postepeno formirati moždana kora čovjeka. Kako bi se spoznao razvoj i raznolikost subpopulacija neurona središnjeg živčanog sustava, koje imaju esencijalnu ulogu u stvaranju, pohrani, obrađivanju i prijenosu signala (informacije), bitno je poznavati njihovu morfologiju i prenatalni razvoj. Tijekom embrionalnog razvoja progenitorske neuroepitelne stanice proliferiraju simetričnim mitotičkim diobama, a nakon određenog vremena, počinju se dijeliti asimetrično. Novorođene stanice putuju do svojeg konačnog odredišta gdje se zaustavljaju, morfološki i kemijski diferenciraju u raznovrsne subpopulacije koje imaju različite funkcije. Histogenetskim procesima se formira šest fetalnih zona koje se tijekom perinatalnog razdoblja postepeno transformiraju, te ih nema u postnatalnoj moždanoj kori (Kostović i Judaš, 2015; Judaš i Kostović 1997).

Za formiranje normalne laminarne organizacije šestoslojnog neokorteksa, ključna je precizna regulacija ekspresije gena od transkripcije do nastanka proteina. Osim regulacije transkripcije, strogi post-transkripcijski mehanizmi sudjeluju u metabolizmu RNA molekula regulirajući time njihovo alternativno procesiranje, transport, stabilnost, lokalizaciju i translaciju. Pri tome, nezamjenjivu ulogu imaju RNA-vezujući proteini, čiji molekularni mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti jasni

(Popovitchenko i Rasin, 2017), a njihova nepravilna regulacija može voditi do neurorazvojnih poremećaja (Rubenstein, 2011).

Stoga je cilj ovog diplomskog rada proučiti prenatalni ekspresijski obrazac RNA-vezujućeg proteina HuD, kodiranog *ELAVL4* genom, u moždanoj kori, koji se pokazao kao bitan čimbenik u regulaciji post-transkripcijskih mehanizama tijekom ekspresije brojnih mRNA molekula. Prethodno je pokazano da gubitak funkcije HuD doprinosi defektu dendritogeneze i nemogućnošću specifikacije neurona (De Boer i sur., 2014). Obrazac ekspresije RNA-vezujućeg proteina HuD u privremenim fetalnim zonama u mozgu čovjeka još uvijek je neistražen, iako je nedavna studija (Popovitchenko i sur., 2020) metodama korištenim u ovom diplomskom radu, prikazala obrazac ekspresije *ELAVL4* mRNA u proliferativnim fetalnim zonama. U ovom diplomskom radu, koristili smo uzorke postmortalnog fetalnog moždanog tkiva čovjeka između 10. i 21. tjedna nakon začeća te smo metodom *in situ* hibridizacije utvrdili ekspresijski obrazac mRNA *ELAVL4* gena, a metodom imunofluorescencije ekspresijski obrazac RNA-vezujućeg proteina HuD u stijenci fetalnog telencefalona.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Osnovna podjela i organizacija središnjeg živčanog sustava

Mozak je najkompleksniji organ u ljudskom tijelu koji prima, obrađuje, pohranjuje i prenosi živčane signale u ostale dijelove tijela. Živčani sustav (*systema nervosum, lat.*) se sastoji od perifernog živčanog sustava (PŽS - *systema nervosum periphericum*) i središnjeg živčanog sustava (SŽS - *systema nervosum centrale*). Periferni živčani sustav čine živci i manje nakupine živčanih stanica odnosno gangliji, dok središnji živčani sustav čine dvije komponente: mozak (*encephalon*) i kralježnična moždina (*medulla spinalis*). Lubanja i kralježnica čine čvrsti koštani oklop, koji odvaja živčano tkivo koje se nalazi unutar oklopa, od ostatka tijela, te ga štiti. Pri tome se unutar koštanog oklopa u lubanjskoj praznini nalazi mozak dok se unutar šupljine kralježničkog kanala nalazi kralježnična moždina. Mozak se time sastoji od tri dijela: moždanog debla (*truncus encephalicus*), velikog mozga (*cerebrum*) i malog mozga (*cerebellum*). Unutar tri strukturne podjedinice, veliki mozak se sastoji od dva dijela: mali međumozak (*diencephalon*) i krajnji mozak (*telencephalon*) što oblikuje dvije moždane polutke (*hemisphaeria cerebri*). Površinu velikog mozga oblaže siva tvar (*substantia grisea*) koja pritom čini moždanu koru (*cortex cerebri*), dok se bijela tvar (*substantia alba*) nalazi u unutrašnjosti. Kompleksnost velikog i malog mozga čine nabori na površini u koje spadaju žljebovi (*sulci*), pukotine (*fissurae*) i vijuge (*gyri*) pri čemu pukotine razdvajaju režnjeve (*lobi*) i režnjiće (*lobuli*) mozga (Judaš i Kostović, 1997).

### 2.2. Građa i raznolikost živčanih stanica središnjeg živčanog sustava

#### 2.2.1. Neuron

SŽS se sastoji od dvije glavne vrste stanica: živčanih stanica (neurona) i glija stanica. Neuron je osnovna i strukturna funkcionalna jedinica mozga koja može stvarati, primiti, obraditi i prenijeti signale tj. živčane impulse na druge neurone ili druge vrste tjelesnih stanica poput mišićnih i žljezdanih stanica u organizmu. Neuron se sastoji od tijela zvanog *soma* koje uključuje jezgru i citoplazmu a okružuju je dendriti i dugi nastavak - akson. Akson obavija mijelinska ovojnica, a na pojedinim mjestima ovojnica je isprekidana čineći Ranvierova suženja koja omogućuju skokovito vođenje akcijskog potencijala. Aksonski završeci presinaptičkog neurona time prenose živčani impuls putem

sinapsi na postsinaptički neuron ili drugu ciljnu stanicu. Sinapsa je strukturno-funkcionalni spoj, odnosno mjesto interakcije između neurona između kojih se prenosi živčani signal (Judaš i Kostović, 1997).

Budući da obavljaju kompleksne funkcije, neuroni se razlikuju građom, veličinom i biokemijskim svojstvima od ostalih stanica. Neuroni se dijele prema broju staničnih nastavaka na unipolarne, bipolarne i multipolarne neurone. Unipolarni neuroni imaju jedan stanični nastavak, bipolarni neuroni imaju dva suprotno usmjerena stanična nastavka dok multipolarni neuroni imaju nekoliko dendrita i jedan akson, te čine većinu stanica SŽS. Osim razlike u broju staničnih nastavaka, neuroni se razlikuju i u dužini i projekciji aksona što im određuje njihovu funkciju. Tako interneuroni imaju kratke aksone (lokalni neuroni), dok projekcijski neuroni sadrže duge aksone što omogućuje prijenos živčanog impulsa iz jednog moždanog područja u drugo. S obzirom na smjer putovanja živčanog impulsa razlikuju se eferentni projekcijski neuroni koji odnose živčani impuls putem eferentnog aksona, te aferentni aksoni projekcijskih neurona koji donose živčani impuls. U eferentne projekcijske neurone spadaju piramidni neuroni moždane kore koji su zaslužni za oblikovanje voljnih motoričkih puteva. Neuroni se također dijele i po veličini tijela pa tako mogu biti patuljasti, mali, srednje veliki, veliki i divovski dok oblik samog tijela neurona može biti okruglo (zrnati, granulirani neuroni), izduljeno (vretenasti neuroni), poput nepravilnih mnogokuta (poligonalni neuroni) i trokutasto (piramidni neuroni). Što se tiče citoarhitektonske strukture, neuroni se raspoređuju u jezgre (*nucleus*), slojeve (*lamina*), koru (*cortex*) i stupiće (*columnae*). Pritom bi jezgra označavala nakupine neurona koji imaju ista citološka svojstva dok određeni neuroni mogu biti poredani u slojeve jedno iznad drugoga čime izgrađuju sivu tvar koja obavlja veliki i mali mozak. Stupići ili kolumne u SŽS imaju više značenja, a pri opisu ustrojstva moždane kore označavaju okomit stupićasti raspored postavljen radijalno u odnosu na pijalnu površinu (Judaš i Kostović, 1997).

### 2.2.2. Glija stanice

Osim neurona, SŽS i PŽS na staničnoj razini izgrađuju i glija stanica. Ovisno o mjestu na kojem se nalaze, glija stanice imaju višestruke funkcije pomažući neuronima uspješno komuniciranje na način da im osiguravaju potrebnu koncentraciju iona i neurotransmitera u neuronskom okruženju. Nadalje, sudjeluju u formiranju mijelinskih ovojnica oko aksona omogućujući brzo provođenje živčanih impulsa (Judaš i Kostović 1997; Jessen 2004). Glija stanice, za razliku od neurona, nemaju natrijske kanale uronjene u staničnu membranu ali imaju kalijeve naponske kanale, mogu se dijeliti, nemaju

aksona te prema tome ne mogu provoditi živčane impulse. Glija stanice se u SŽS dijele na makrogliju koja se razvija tijekom embrionalnog razvoja iz ektoderma a obuhvaća astrocite i oligodendrocite te mikrogliju koja se tijekom fetalnog života razvija iz mezoderma. Oligodendrociti izgrađuju mijelinsku ovojnici koja ovija akson SŽS dok astrociti održavaju homeostazu iona i pH vrijednosti izvanstanične tekućine moždanog tkiva te sintetiziraju preteču neurotransmitera (Judaš i Kostović 1997). Neki astrociti održavaju čvrstu krvno-moždanu barijeru onemogućavajući neželjenim tvarima ulazak u SŽS, dok neki tvore čvrstu vezu sa sinapsama regulirajući sinaptički prijenos signala između neurona (Jessen, 2004). Nadalje, u PŽS postoje Schwannove i satelitne stanice (Judaš i Kostović, 1997). Mijelinizirajuće Schwannove stanice stvaraju omotač oko aksona dok su nemijelinizirajuće stanice po funkciji slične astrocitima te imaju mehaničku i metaboličku funkciju (Jessen, 2004).

### 2.3. Razvoj moždane kore tijekom prenatalnog razdoblja čovjeka

#### 2.3.1. Histogenetski procesi i privremene fetalne zone

Kako bi se analizirao razvoj promjene strukture i staničnih događaja koji omogućavaju arealno, laminarno i regionalno formiranje ustrojstva moždane kore, primjenjuju se histološke i molekularno biološke metode na postmortalnim humanim uzorcima te se uspoređuju sa studijima na životinjskim uzorcima (Kostović i Judaš, 2015). Tijekom 3. i 4. tjedna embriogeneze, iz zametnog listića ektoderma procesima mitoze nastaje sloj nediferenciranih stupićastih neuroepitelnih stanica čineći neuralnu ploču. Uzdizanjem lateralnih rubova neuralne ploče nastaju lateralni nabori, a zbog sve jačeg uzdizanja lateralnih nabora dolazi do primicanja središnjoj crti čime posljedično nastaje neuralna cijev. Neuralna cijev tijekom embrionalnog i fetalnog razdoblja prolazi kroz niz promjena koje uključuju promjenu veličine, promjenu oblika i promjenu unutrašnje građe stijenke neuralne cijevi kako bi nastala tkivna struktura. Poneki dijelovi neuralne cijevi sadrže ista obilježja a neka sadrže posebna (regionalna) obilježja. Prenatalni razvoj neuralne cijevi time obuhvaća niz događaja kako bi se uspostavila histološka građa SŽS zvanih histogenetski procesi. Morfološke promjene oblika neuralne cijevi uzrokuju pojavu pregiba na nekim mjestima gdje se spajanjem nekih od pregiba formiraju primarni i sekundarni moždani mjehurići iz kojih će razviti regionalna podjela odraslog mozga. Primarni moždani mjehurići nastaju proširenjem prednjeg kraja kaudalne cijevi iz kojih će se razviti *prosencephalon* (prednji mozak), *mesencephalon* (srednji mozak) i *rhombencephalon* (stražnji mozak), gdje zatim pojava sekundarnih mjehurića u 5. embrionalnom tjednu uzrokuje podjelu prednjeg mozga na *telencephalon* (krajnji mozak) i *diencephalon* (međumozak), a stražnji mozak se podijeli na

*metencephalon* i *myelencephalon*. Histogenetski procesi su tijekom embrionalnog i fetalnog razvoja obilježeni izrazito progresivnim procesima što obuhvaća proliferaciju i migraciju stanica do ciljnog područja, diferencijaciju morfologije neurona i uspostavljanja specifičnih biokemijsko-metaboličkih puteva za sintezu specifičnih neurotransmitera, razvoj sinapsi i mijelinizaciju. S druge strane, procesima razvojne reorganizacije dolazi do uspostave privremenih fetalnih zona koje ne postoje u mozgu odraslog čovjeka, a specifične su po svojoj strukturi i funkciji. Mnogobrojni neuroni poput neurona u subplate zoni i Cajal-Retziusove stanice te radijalna glija, neurotransmiteri i sinapse odgovorni za razvoj su postojani samo tijekom prenatalnog razvoja mozga i u određenim fazama razvoja nestaju (Judaš i Kostović, 1997). Primjerice, fetalni neuroni privremeno ekspimiraju pojedine neurotransmitere čija se funkcija mijenja tijekom fetalnog razvoja. Tako neurotransmiter gama-aminomaslačna kiselina (skraćeno GABA) mijenja svoju ulogu iz ekscitirajućeg u inhibirajući neurotransmiter što ukazuje na strogu regulaciju funkcije neurotransmitera tijekom razvoja (Kostović i Judaš, 2015).

Histogenetskim procesima dolazi do razvoja i oblikovanja posebnih slojeva stijenki embrionalnog i fetalnog mozga. U embriju se u svim dijelovima neuralne cijevi razlikuju 3 embrionalne univerzalne zone poredane od šupljine neuralne cijevi prema suprotnom dijelu stijenke zvane pija. Takve zone predstavljaju ventrikularnu zonu (VZ), intermedijalnu zonu (IZ) i marginalnu zonu (MZ), dok se u stijenci telencefalona razvijaju još tri posebne zone: subventrikularna zona (SVZ), subplate zone (SZ) i kortikalna ploča (KP) (Judaš i Kostović, 1997). U ranijim stadijima, neuralna cijev se zatvara tridesetog embrionalnog dana. Uz šupljinu neuralne cijevi se nalazi područje slojevitog epitela u kojem dolazi do niza mitotičkih dioba progenitorskih neuroepitelnih stanica zvanih i neuralne matične stanice koje se u početku dijele simetrično i takav sloj stanica predstavlja ventrikularnu zonu (VZ). Ulaskom u mitozu, jezgra stanice se kreće prema površini VZ zvana apikalna površina prije metafaze i citokineze te migrira prema pijalnoj površini tijekom DNA replikacije procesom interkinetičkog pokretanja jezgre. Stanice koje prolaze proces interkinetičkog pokretanja jezgre su polarizirane jer sadrže različitu koncentraciju specifičnih transmembranskih proteina i receptora odgovornih za vezanje na bazalnu laminu u različitim odjeljcima stanice dajući im epitelne karakteristike. Proliferacijom stanica dolazi do povećanja i zadebljanja VZ. Nakon određenog broja simetričnih diobi, neuroepitelne stanice se počinju dijeliti asimetrično čime smanjuju ekspresiju gena odgovornih za epitelne karakteristike. Stanice time prolaze svoju zadnju mitotičku diobu i postaju postmitotičke stanice iz kojih će se razviti neuron ili glija stanica (Bystron i sur., 2008). Stoga je bitno naglasiti da će se stanice progenitora iz kojih će nastati neuroni buduće moždane kore roditi u VZ

sekundarnog mjehurića telencefalona. Vanjski nastavci neuroepitelnih stanica formiraju MZ (Judaš i Kostović, 1997). MZ sadrži Cajal-Retzius stanice koje sintetiziraju glikoprotein, Reelin. Reelin stupa u interakcije s drugim molekulama u ekstracelularnom matriksu (ECM), pri čemu regulira radijalnu migraciju neurona i omogućuje pravilan razvoj kortikalnih slojeva (Chai i Frotscher, 2016). Nadalje, brojne postmitotske stanice napuštaju VZ i putuju prema površini čime oblikuju novi sloj stanica koji se nalazi između VZ i MZ zvan intermedijalna zona (IZ). Putovanje nezrelih postmitotičkih neurona omogućuju radijalne glija stanice, koje spadaju u posebnu skupinu fetalnih astrocita. Radijalne glija (RG) stanice se tijekom razdoblja neuronske migracije privremeno ne dijele te služe kao duge niti odnosno vodiči koje omogućavaju putovanje piramidnih neurona a protežu se skroz od VZ do površine neuralne stijenke. Važno je napomenuti da postoje dvije vrste migracije neurona u slojeve budućeg neokorteksa: radijalna i tangencijalna migracija. Pri tome piramidni neuroni koji potječu iz VZ migriraju radijalno, što bi označavalo okomit položaj u odnosu na pijalnu površinu dok interneuroni iz SVZ slijede tangencijalne, odnosno vodoravne puteve migracije u odnosu na pijalnu površinu (Bystron i sur., 2008).

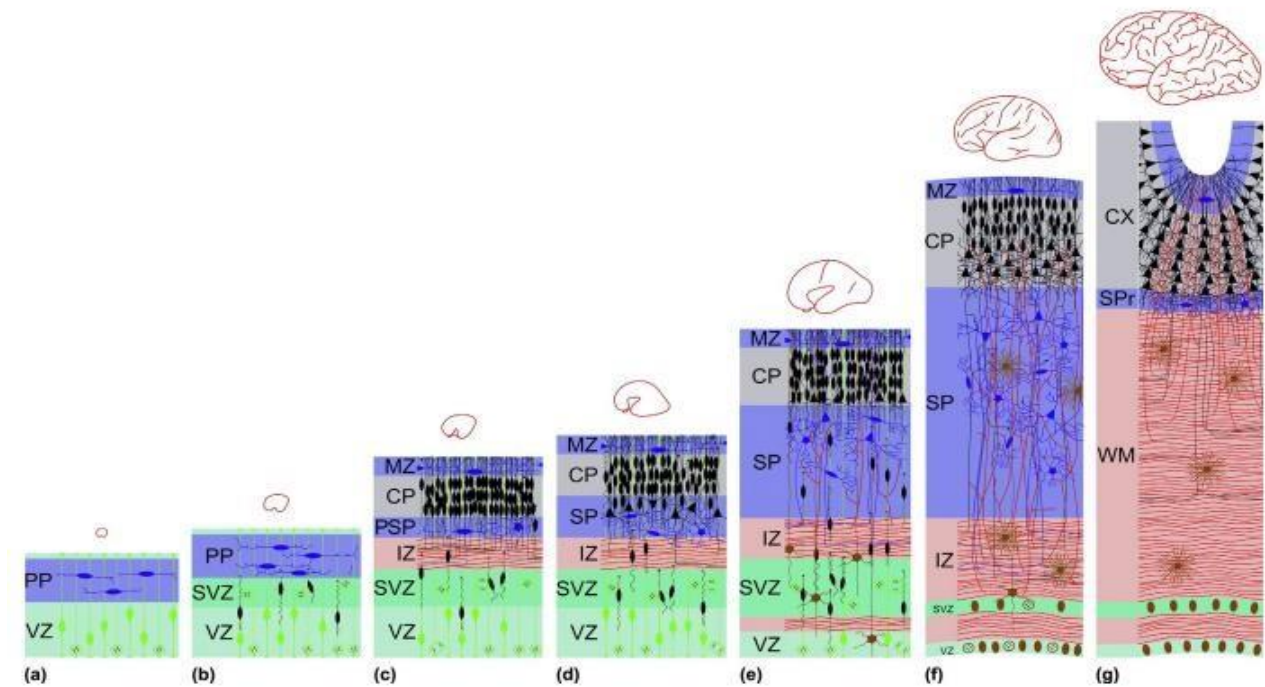
Tijekom 6. tjedna embrionalnog razvoja dolazi do pojave nove subventrikularne zone (SVZ), koja je smještena između VZ i IZ, a nije karakteristična za sve dijelove neuralne cijevi već samo za telencefalona. SVZ također predstavlja proliferativnu zonu neuroepitelnih progenitorskih stanica koje prolaze svoju zadnju mitozu (Judaš i Kostović, 1997). Stanice VZ i SVZ su dakle preteče neurona i makroglija SŽS te se nazivaju „tvornicama“ korteksa. U usporedbi s glodavcima, primati i ljudi imaju veći broj mitotičkih dioba u proliferativnim zonama. Novonastali neuroni migriraju od ventrikularne zone prema pijalnoj površini i smještaju se po principu da ranije rođeni neuroni zauzimaju dublje slojeve korteksa, dok će se kasnije rođeni neuroni smjestiti u površnije dijelove moždane kore (Kostović i Judaš, 2015). Osim što predstavlja zonu proliferacije stanica, SVZ također predstavlja područje regionalne histogeneze telencefalona koja se u potpunosti razvija pojavom kortikalne ploče (KP) krajem 8. tjedna embrionalnog razdoblja. Pojava KP na granici IZ i MZ obilježava rano fetalno razdoblje (Judaš i Kostović, 1997).

Bitno je naglasiti da su proliferacijske jedinice VZ mozaici koji formiraju neurone različitih fenotipova koji nakon završetka radijalne migracije oblikuju odgovarajuće ontogenetske kolumne u KP. Naime, nakon 40. embrionalnog dana, stanice progenitori imaju više mogućnosti: mogu se početi dijeliti asimetričnim diobama stvarajući neurone, mogu ostati matične ili proći kroz staničnu smrt. Nakon svoje zadnje diobe, neuroni trebaju diferencirati u određeni fenotip i dosegnuti svoju konačnu destinaciju u moždanoj kori. Primjerice, neuroni rođeni u jednoj proliferacijskoj jedinici između 40. i



100. embrionalnog dana migriraju uzduž iste radijalne glije kroz IZ, SP te nakon što dođu do KP zaobilaze ranije rođene neurone i smještaju se više površinski, na sučelju KP i MZ, unutar iste ontogenetske kolumne. Stoga sve postmitotske stanice nastale iz jedne proliferativne jedinice na kraju tvore morfološki prepoznatljiv niz neurona u KP nazvanoj embrionalne ili ontogenetske kolumne (Rakić, 1988).

Stanice najdublje smještene u KP postepeno oblikuju subplate zonu (SP) u razdoblju između 12. i 15. tjedna gestacije (eng. gestation week, GW) koja se nalazi između KP i IZ. Između 15. i 35. tjedna nakon začeca (TNZ) SP predstavlja najdeblji prolazni odjeljak fetalnih zona telencefalona u kojem se odvija sazrijevanje i diferencijacija neurona te sinaptogeneza što je izrazito bitno za razvoj moždane kore. Piramidni neuroni eksprimiraju različite molekularne markere poput neurotransmitera gdje je u SP prisutan GABA i glutamergički neurotransmiter čija uloga tijekom razvoja još nije u potpunosti razjašnjena. Sinaptogeneza predstavlja važan histogenetski proces i podrazumjeva razvoj sinapsi između neurona koja se u SP odvija između 15. i 24. TNZ pri čemu talamički aksoni uspostavljaju privremene sinapse. Talamički aksoni u SP čekaju 2 do 3 mjeseca rođenje svojih ciljnih postsinaptičkih neurona, te između 24. i 28. TNZ počinju urastati u KP. Preostali dio aktivnosti SP, između 28. i 34. TNZ, predstavlja i dalje intenzivnu sinaptogenezu, te formiranje „bijeke tvari“ fetalnog mozga. Nadalje, nakon 34. TNZ, SP se postupno smanjuje ali ne nestaje potpuno već dio ostaje prisutan u novorođenčadi i ranom postnatalnom razvoju. Time mnogi neuroni iz SP u velikom broju ostaju prisutni u bijeloj tvari mozga odraslog čovjeka (Kostović i sur., 2015).



**Slika 1.** Prikaz razvoja laminacije neokorteksa od ranog embrionalnog do kasnog fetalnog razdoblja. Proliferativne zone: VZ; ventrikularna zona i SVZ; subventrikularna zona su prikazane zelenom bojom. Zone u kojima dolazi do rane sinaptogeneze, te slojevi s postmigratornim neuronima poput PP; preplate zone, SP; subplate zone te MZ; marginalne zone su prikazani plavom bojom. KP; Kortikalna ploča, je prikazana sivom bojom, fetalna „bijela tvar“, intermedijalna zona (IZ), je prikazana crvenom bojom, stanice progenitora zeleno, neuroni MZ i SP plavo, neuroni KP crno, dok su glija stanice prikazane smeđom bojom (Preuzeto iz Kostović i Judaš, 2015).

Prenatalni razvoj moždane kore obuhvaća niz procesa koji se vremenski preklapaju, tako primjerice dok se neki neuroni još nisu rodili u VZ ili SVZ, drugi neuroni migriraju do svojeg konačnog odredišta ili već uspostavljaju sinapse. Tijekom formiranja moždane kore u čovjeka, takvo preklapanje traje 5 do 6 mjeseci. Konačno, razvojem stijenke telencefalona nastaju šest fetalnih zona: ventrikularna zona (VZ), subventrikularna zona (SVZ), intermedijalna zone (IZ), subplate zona (SP), kortikalna ploča (KP) i marginalna zona (MZ). Posljedično, u odrasloj moždanoj kori od VZ i SVZ ostane tek tanak sloj endodimskih stanica čineći stijenku moždanih komora, iz IZ se razvila bijela tvar moždanih polutki dok površinske zone SP, KP i MZ predstavljaju razvojnu osnovu moždane kore (Judaš i Kostović, 1997).

### 2.3.2. Programirana stanična smrt u središnjem živčanom sustavu

Kako bi se uspostavila odgovarajuća populacija neurona i glija stanica, programirana stanična smrt zvana apoptoza u pojedinim stanicama progenitora, postmitotičkih neurona i glija stanica predstavlja normalnu pojavu tijekom razvoja mozga. Stanice tijekom razvoja zahtijevaju neurotrofički čimbenik rasta (eng. nerve growth factor, NGF) koji potiče rast neurona a tijekom dva tjedna nakon rođenja se ne veže za tirozinske receptore inervirajućih aksona na površini stanice. Nedostatkom signala, mijenja se ekspresija gena odgovornih za rast stanice te se aktiviraju putevi za apoptozu čime dolazi do fragmentacije DNA, nastanka apoptotskih tjelešca i pojedine stanice odlaze u smrt. Apoptoza je rezultat i nedostatka glukoze što uzrokuje smanjenu transkripciju i sintezu proteina bitnih za održavanje homeostaze stanice (Kristiansen i Ham, 2014). U SŽS stanice koje podliježu apoptozi razgrađuju tkivno specifični makrofagi, u mozgu zvani mikroglije, koje osim toga reguliraju razvoj sinapsi kako bi se održala homeostaza SŽS. Tijekom prenatalnog razvoja mozga, mikroglija stanice nastaju diferencijacijom hematopoetskih matičnih stanica i koloniziraju neuralnu ploču 10. embrionalnog dana. Broj mikroglije se povećava razvojem moždane kore a u početku su u većem broju prisutne u proliferativnim zonama, VZ i SVZ. Kako bi se uspjela održati homeostaza SŽS tijekom razvoja mozga, mikroglija se pokazala vodećim čimbenikom u fagocitiranju i održavanju stanične smrti stanica progenitora kako bi se održao odgovarajući broj populacije progenitora. S druge strane, mikroglija stanice su se također pokazale bitnima u regulaciji sinaptogeneze jer mogu odstranjivati sinapse i aksonske ogranke koje se nalaze u prevelikom broju (Kong Tong i Vidyadaran, 2016).

### 2.4. Struktura moždane kore odraslog čovjeka

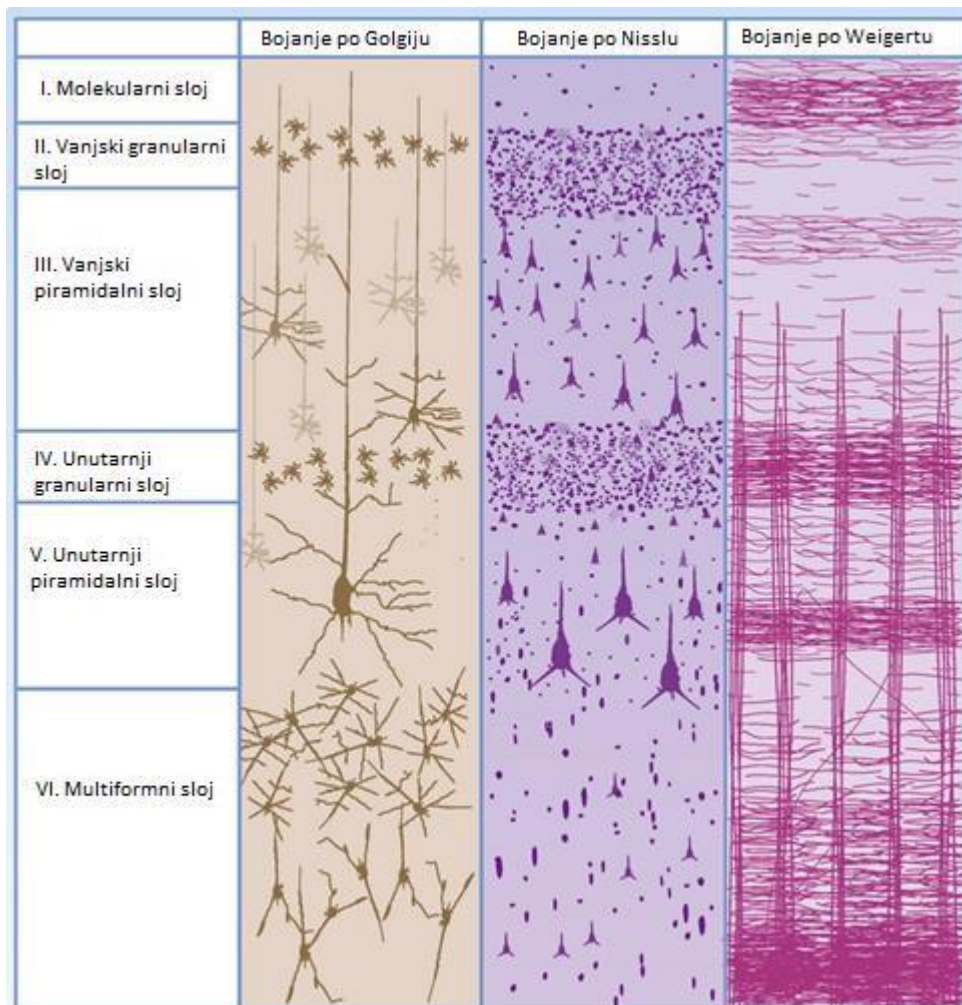
Moždana kora (*cortex cerebri*) ili kora velikog mozga čini više od polovice volumena mozga čovjeka i odgovorna je za stvaranje percepcije, razmišljanja, govora, memorije, pažnje i voljnih pokreta. (Molnar i sur., 2019) Moždana kora prekriva najveći dio površine velikog mozga i cijelu površinu telencefalona, a ispod moždane kore se nalazi bijela tvar velikog mozga, u čijoj su dubini smještene moždane komore i bazalni gangliji. Obje moždane polutke se dijele na četiri glavna režnja: čeonni režanj (*lobus frontalis*), tjemeni režanj (*lobus parietalis*), zatiljni režanj (*lobus occipitalis*) i sljepoočni režanj (*lobus temporalis*). Najveći dio moždane kore odraslog čovjeka (90%) razvije se iz 6 temeljnih slojeva tijekom razvojnog stadija pa se takav dio kore naziva izogenetski korteks odnosno neokorteks. Preostali dio moždane kore se razvije iz drugačije razvojne osnove pa se taj dio moždane kore naziva alogenetski korteks (Judaš i Kostović, 1997). Gledajući od pjalne površine prema

unutrašnjosti, 6 slojeva neokorteksa se bilježi brojevima I-VI, čime svaki sloj ima svoje posebne značajke (Slika 2). Sloj I se naziva i molekularni sloj koji ima vrlo mali broj stanica, a bogat je aksonima i dendritima. Sloj II nazvan vanjski granularni sloj stanica, sadrži veliki broj granuliranih stanica, sloj III odnosno vanjski sloj piramidnih stanica sastavljen je pretežito od piramidnih stanica i razbacanih nepiramidnih stanica, sloj IV nazvan unutarnji sloj granuliranih stanica, sloj V ili unutarnji sloj piramidnih stanica te tanki sloj VI sastavljen od gusto poredanih stanica, nazvan multiformni sloj. Dakle, morfologija neurona doprinosi vidljivoj podjeli svakog sloja moždane kore (Fatterpekar i sur., 2002; Popovitchenko i Rasin, 2017).

1909. godine njemački znanstvenik Korbinian Brodmann osmislio je citoarhitektonsku podjelu moždane kore označeno brojevima 1-52, na temelju regionalnih razlika u distribuciji, gustoći, obliku i veličini tijela stanice. Polja s brojevima 12-16 i 48-51 nisu prikazana u njegovoj mapi što je objašnjeno činjenicom da neka područja nisu detektirana u ljudskom korteksu, ali su razvijena u ostalim vrsta sisavaca (Zilles i Amunts, 2010). Svako polje je zaduženo za različite voljne funkcije pa se moždana kora opisuje i kao jedinstven dio mozga odgovoran za više misaone procese i ljudsku posebnost.

Moždana kora odraslog čovjeka sadržava veliki broj raznovrsnih neurona organiziranih u slojeve (*laminae*) i stupiće (*columnae*). Neuroni neokorteksa se dijele na piramidne, smješteni pretežno u II., III, i V. sloju, i nepiramidne neurone zvane i interneuroni, smješteni u svim slojevima, a najviše u IV. sloju. Piramidni neuroni čine najveći dio kortikalnih neurona a specifični su po izlučivanju neurotransmitera ekscitacijskog djelovanja, glutamata, dok manji broj piramidnih neurona izlučuje i druge vrste neurotransmitera poput aspartata. S druge strane, interneuroni izlučuju neurotransmitere suprotnog djelovanja, GABA (gama-amino-butirična-kiselina) inhibicijske neurotransmitere, koji za razliku od piramidnih neurona luče neurotransmitere u okolinu lokalnih neuronskih krugova moždane kore (Judaš i Kostović, 1997).

Kako bi se spoznala građa stanica moždane kore, primjenjuju se tri klasične neurohistološke metode. Golgijeva metoda omogućava bojenje neurona srebrnim solima pri čemu se može identificirati oblik neurona svakog pojedinog sloja, Nisslova metoda omogućuje prikaz tijela stanice neurona, čime se boje nukleinske kiseline i ribosomi, dok metoda po Weigertu boji i prikazuje mijelinizirane aksone. Otkriće navedenih metoda je značajno doprinijelo razumijevanju morfologije i funkcije neurona svakog pojedinačnog sloja (Kostović i sur., 1997).



**Slika 2.** Prikaz 6 slojeva neokorteksa obojanog trima različitim metodama. Obojenje po Golgiju prikazuje dio populacije neurona pri čemu su vidljivi njihovi dendriti. Obojenje po Nisslu prikazuje citoarhitektoniku, dok Weigertovo obojenje prikazuje snopove aksona (Anonymous, 2016).

## 2.5. Uloga i post-transkripcijski mehanizmi djelovanja RNA-vezujućih proteina bitnih za razvoj moždane kore

Centralna dogma genske ekspresije obuhvaća dva procesa, transkripciju i translaciju (Guo 2014). Svaki navedeni korak je strogo reguliran (Lennox i sur., 2018). Primjerice, brojni transkripcijski faktori surađuju zajedno čime aktiviraju ili reprimiraju promotore i time utječu na ekspresiju gena (Keene, 2007). Osim regulacije ekspresije gena na razini transkripcije, bitnu ulogu imaju i posttranskripcijski mehanizmi u koje spadaju RNA-vezujući proteini (eng. RNA binding proteins, RBP), kratke nekodirajuće miRNA (eng. micro-RNA) molekule (<200 nukleotida) i duge nekodirajuće lcnRNA (eng. long non-coding RNA) molekule (>200 nukleotida). Navedeni post-transkripcijski faktori reguliraju alternativno procesiranje (eng. alternative splicing, AS), stabilnost, lokalizaciju i translaciju mRNA pri čemu mogu djelovati kooperativno ili zasebno, svrstavajući se u kompleksne razrede. RBP utječu na ekspresiju pojedinih mRNA molekula u progenitorima neurona što ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije mRNA tijekom razvoja moždane kore, te ukoliko dođe do njihove deregulacije, i razvoja neurorazvojnih poremećaja. Za normalan razvoj moždane kore tijekom embrionalnog i fetalnog razdoblja potrebna je savršena genska regulacija i koordinacija u pozadini histogenetskih procesa, u koje se ubrajaju proliferacija nediferenciranih živčanih stanica progenitora, migracija postmitotičkih neurona i njihova diferencijacija što utječe na sudbinu stanice (Lennox i sur., 2018).

Prvi korak post-transkripcijskog mehanizma uključuje izrezivanje primarnog transkripta procesom alternativnog procesiranja (AS). U alternativnom procesiranju ključnu ulogu imaju RNA-vezujući proteini koji mogu regulirati ekspresiju mRNA molekula zasebno ili surađujući s drugim proteinima tvoreći protein-protein interakcije, te na taj način omogućiti ili spriječiti procesiranje primarnog transkripta. RBPs sadrže visoko konzervirane sekundarne strukture  $\beta$ -nabranih ploča i  $\alpha$ -uzvojnica koje se sastoje od 80-90 aminokiselinskih domena čime omogućavaju vezanje na specifične konsenzus sekvence primarnog transkripta čineći ribonukleoproteinske komplekse i time doprinose različitom izrezivanju introna i egzona (Rio, 1992). Konsenzus sekvence se većinom nalaze u 3'-netranslatirajućoj regiji (eng. 3'-untranslational region, UTR) mRNA ali mogu biti prisutne u 5'-netranslatirajućoj regiji (eng. 5'-untranslational region, UTR) i kodirajućim sekvencama. Cis-djelujuće determinante su prepoznate od strane trans-djelujućih faktora, RBP, koji najčešće prepoznaju specifičnu sekundarnu strukturu, često strukturu ukusnice (Di Liegro i sur., 2014). Primjerice, jedan

od poznatijih RBP iz NOVA obitelji (eng. neuro-oncological ventral antigen) regulira AS vezujući se na veliki broj transkripta i time regulira ispravnu migraciju neurona do kortikalne ploče (Tablica 1).

Nastankom zrelog transkripta, prijenosni proteini iznose zrelu mRNA iz jezgre u citoplazmu djelujući zasebno ili kooperativno s trans-vezujućim faktorima RBP ciljajući time pojedine mRNA subpopulacije (Keene, 2007). Izvan jezgre, stabilnost i regulacija translacije predstavljaju još jedan korak u kontroli ekspresije gena. Translacija se može regulirati na razini sljedećih koraka: inicijacije, elongacije i terminacije. Ovi koraci se reguliraju koordinacijom između ribosomalnih kompleksa i raznih RBP (Pilaz i Silver, 2015). Kako bi se postigla asimetričnost i polarnost neurona tijekom razvoja moždane kore, mRNA bitna za dendritogenezu mora biti transportirana i lokalno translirana (Zivraj i sur., 2010). Pri tome, RBP stupaju u interakciju s motoričkim proteinima odgovornih za prijenos mRNA u pojedine stanične odjeljke. mRNA time putuje uz mikrotubule i nedostupna je za sintezu proteina zbog represije regulatornih proteina sve dok ne dosegne svoju konačnu destinaciju (Van Driesche i KC, 2018). Cis-regulatorni elementi na 5' i 3' UTR krajevima mRNA omogućavaju lokalnu translaciju proteina u odvojene subcelularne odjeljke što posljedično doprinosi razvoju sinapsi, dendrita i aksona (Zivraj i sur., 2010). Ovisno o unutarstaničnim ili izvanstaničnim signalima, omogućuje se regulacija translacije u lokaliziranim odjeljcima stanice. Poneki RBP time potiču ili zaustavljaju translaciju i tako omogućavaju regulaciju faze razvoja i migracije neurona (Pilaz i Silver, 2015).

Post-transkripcijski mehanizmi objašnjavaju kompleksnu ulogu RBP u metabolizmu RNA molekula. Živčani sustav sadrži veliku količinu RBP od kojih su se neki pokazali kao ključni faktori u regulaciji molekula koje imaju ulogu u dendritogenezi i diferencijaciji složene citoarhitektonske strukture neurona. Stoga su potrebna daljnja istraživanja disfunkcionalnih RBP, miRNA ili mutiranih mRNA molekula bitnih u neurogenezi da bi se došlo do boljeg razumjevanja progresivnih neuroloških poremećaja, poput poremećaja X-lomljivog kromosoma, spinalne mišićne atrofije ili amiotrofične lateralne skleroze, te potencijalno do otkrivanja novih terapeutika (Bronicki i Jasmin, 2013) (Prikazano u tablici 1).

**Tablica 1.** Prikaz nekih od ključnih uloga i posljedica disfunkcionalnosti RNA-vezujućih proteina u prenatalnom i postnatalnom mozgu čovjeka.

<b>RNA-vezujući proteini</b>	<b>Uloga u kortikalnom razvoju</b>	<b>Poznata funkcija</b>	<b>Neurološke bolesti</b>	<b>Literatura</b>
NOVA obitelj	Inhibicija specifičnih mRNA molekula	Alternativno procesiranje, poliadenilacija	Paraneoplastični opsoclonus mioklonus ataksija	(Zhou i sur. 2014)
CELF obitelj	Razvoj i diferencijacija neurona	Alternativno procesiranje, stabilnost mRNA, translacija	Miotonična distrofija, spinalna mišićna atrofija, autizam, epilepsija	(Popovitchenko i sur, 2020; Bryant i Yazdani, 2016; Gallo i Spickett, 2010)
HuD	Proliferacija progenitora neurona, laminacija, kontrola postnatalnog razvoja	RNA stabilnost i translacija, iznosi RNA iz jezgre	Shizofrenija, epilepsija, tumori pluća, bolesti u CNS-u; Parkinsonova bolest i Alzheimerova demencija, spinalna mišićna atrofija, amiotrofična lateralna skleroza	(Keene, 2007; Bronicki i Bernard, 2013; Zhou i sur. 2014; Zivraj i sur, 2010)
HuR	Proliferacija progenitora	RNA stabilnost i translacija	Neurofibromatoza tipa 1, amiotrofična lateralna skleroza, spinalna mišićna atrofija	(Lennox i sur, 2018; Srikantan i Gorospe; 2015)
FMRP	Migracija i polarnost neurona	Translacija, transport, stabilnost mRNA	Autizam, shizofrenija	(Lennox i sur, 2018; Zhou i sur., 2014; Bryant i Yazdani, 2016)



## 2.6. Važnost *ELAVL4* gena tijekom razvoja moždane kore

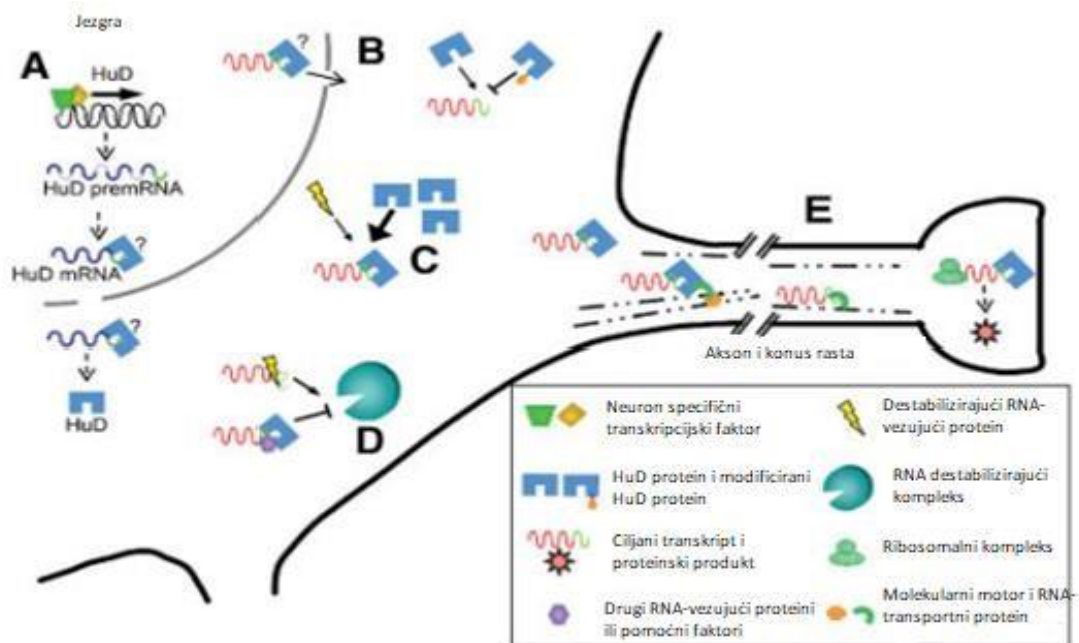
Hu obitelj predstavlja porodicu RBP koji sudjeluju u razvoju i diferencijaciji neurona, a dijele se na subporodice HuB, HuC, HuR i HuD. Hu proteini su kodirani *ELAVL* genima koji su homologni *Drosophila embryonic lethal abnormal vision (elav)* genima iz mušice *Drosophila Melanogaster* te sudjeluju u normalnom razvoju i održavanju živčanog sustava. Delecija *ELAVL* gena u *Drosophila* je embrionalno letalna budući da neuroni ne mogu diferencirati. Ime Hu potječe od prvih incijala pacijenta iz kojeg je izoliran antigen *ELAVL* gena. Od svih subporodica, *ELAVL4* koji kodira za HuD protein se smatra jednim od najranijih markera neuralnih stanica kao i esencijalni regulator u diferencijaciji neurona i njihovom preživljavanju (Bronicki i Jasmin, 2013). Ekspresija HuB, HuC i HuD je striktno eksprimirana u centralnim i perifernim neuronima dok je HuR eksprimiran i u ostalim vrstama stanica. Hu proteini sadržavaju tri RNA prepoznajuća motiva, RRM (eng. RNA-recognition motifs): RRM1, RRM2 i RRM3. RRM1 i RRM2 stupaju u interakcije i time prepoznaju AU-bogate sekvence na 3' UTR regiji mRNA molekula čime doprinose njenoj stabilnosti. S druge strane reguliraju translaciju djelujući kao pojačivači ili represori. U jezgri predstavljaju regulatore AS (čime stupanjem u interakcije sa spliceosomalnim faktorima utječu na izrezivanje ili povezivanje egzona) i poliadenilacije (Zhou i sur., 2014).

*ELAVL4* gen je velik oko 146 pb, a nalazi se na kromosomu 1 (1p34). Neki egzoni su odvojeni dugačkim intronskim regijama, a poneki egzoni nisu kodirajući, odnosno podliježu izrezivanju tijekom AP čime nastaju tri različite forme proteina: HuDpro, HuD i HuDmex od kojih su HuDpro i HuD eksprimirani i u postnatalnom mozgu miša. Sve tri varijante HuD proteina sadrže varijabilne RRM što im omogućava specifičnost vezanja na pre-mRNA, mRNA, pre-RNA ili male nuklearne i heteronuklearne RNA molekule (Furry-Deschenes i sur., 2006). *ELAVL4* ima mnogobrojne uloge u neuronima tijekom prenatalnog razvoja gdje sudjeluje u regulaciji post-transkripcijskih mehanizama specifičnih mRNA i time utječe na ekspresiju mnogih proteina koji imaju bitnu ulogu u pojedinim fazama razvoja, primjerice rasta izdanaka aksona i remodeliranja sinaptičkih vezi. Time se tijekom procesiranja transkripta veže na 3' UTR poliadenilirane mRNA proteina koji je neurospecifičan čime sprječava degradaciju i inducira ekspresiju proteina. Posebice ima puno veći afinitet za vezanje na transkript koji ima poli-A kraj duži od 150 adenina čime se povećava stabilnost mRNA (Beckel-Mitchener i sur. 2002). Nadalje, kad je povećano eksprimiran u nezrelim stanicama neurona, HuD inducira diferencijaciju neurona i time negativno utječe na proliferaciju progenitora neurona čime inducira izlazak iz staničnog ciklusa (Akamatsu i sur. 2005). Iako su Hu proteini u većini znanstvenih

radova opisani kao markeri regulacije tijekom ranog razvoja neurona, u nekim neuronima Hu proteini ostaju aktivni i tijekom života, posebice u korteksu i hipokampusu. HuD se pokazao eksprimiranim u somi i dendritima piramidnih neurona, posebice u hipokampusu (Bolognani i sur., 2004). Također, HuD se pokazao kao ključan marker u regeneraciji aksona perifernih neurona. Naime, nakon ozljede neurona, povećana ekspresija HuD rezultira vezanjem za poznatu metu, GAP-43 mRNA koja kodira za protein koji doprinosi rastu dorzalnih korijena ganglijskih neurona (Anderson i sur., 2003).

Ekspresija HuD je strogo regulirana u pojedinim zonama tijekom određenih faza razvoja moždane kore. Prema nedavnom saznanju (Popovitchenko i sur. 2020) ekspresija *ELAVL4* je regulirana RBP CELF1, čime se CELF1 u određenoj fazi razvoja korteksa, veže na alternativnu 5' UTR regiju zrelog transkripta *ELAVL4* i time reprimira njegovu translaciju, dok njegova odsutnost rezultira translacijom HuD proteina i posljedično, razvitkom glutamatergičkih piramidnih neurona.

Kako bi se istražila funkcija nekog gena ili proteina, za istraživanje se koriste modelni organizmi iz čijih stanica se izbacuje željeni gen. Takav pristup se naziva eng. „knockout gene“ čime se mogu analizirati geni koji su vezani uz razvitak određenih bolesti. Primjerice, „knockout“ RBP HuC u neuronima homozigotnog i heterozigotnog miša je rezultiralo epilepsijom, pri čemu se utvrdilo da je HuC zaslužan za regulaciju gena koji sudjeluju u regulaciji glutamata, glavnog ekscitacijskog neurotransmitera u mozgu. S druge strane „knockout“ homozigotnog HuD RBP u miša uzrokuje smanjeni razvoj kranijalnih živaca (Zhou i sur., 2014). Deregulacija RBP HuD dovodi do nemogućnosti kontrole mnogih specifičnih mRNA što je povezano uz nekoliko neurorazvojnih poremećaja poput kognitivnog deficita i shizofrenije ili neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove bolesti i Alzheimerove bolesti. Primjerice, razne studije su proučavale genetičke faktore koji utječu na pojavu Parkinsona u različitoj životnoj dobi. *ELAVL4* gen se nalazi na kraku p kromosoma 1 u regiji nazvanoj PARK10, što znanstvenicima pruža mogućnost istraživanja jednonukleotidnih polimorfizama (eng. single nucleotide polymorphisms (SNPs)) koji mogu biti ključni u razvoju Parkinsonove bolesti tijekom određene dobi čovjeka. Naime, dva od devet SNP *ELAVL4* gena mogu doprinijeti razvoju Parkinsonove bolesti u različitoj životnoj dobi. Jedan SNP se nalazi u intronu 3 dok se drugi nalazi u kodirajućoj regiji egzona 8 *ELAVL4* gena. Ukoliko u egzonu 8 dođe do supstitucije na aminokiselinskom mjestu 270, čime umjesto prolina nastaje serin, između RRM2 i RRM3 mjesta dolazi do promjene sekundarne strukture ukusnice HuD proteina i posljedično promjene vezanja na specifičnu mRNA što može doprinijeti razvoju Parkinsonove bolesti. Točkasta mutacija u intronu 3 se također pokazala ključnom u razvoju ove bolesti ali još nije u potpunosti istraženo budući da intron nije dio kodirajuće regije *ELAVL4* gena (Perrone-Bizzozero i Bird, 2013).



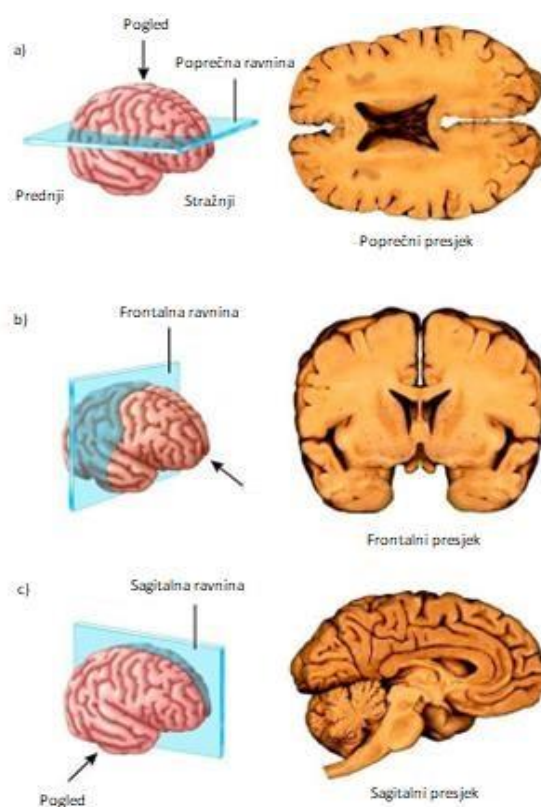
**Slika 3.** Regulacija i funkcija RNA-vezujućeg proteina HuD u neuronu. Slučaj A prikazuje kontroliranu transkripciju HuD gena pomoću specifičnih neuronskih transkripcijskih faktora pri čemu se RNA-vezujući protein HuD može vezati na vlastiti transkript. Slučaj B prikazuje HuD vezan na transkript prepoznat u citoplazmi ili jezgri prije izlaska transkripta iz jezgre. Posttranslacijske modifikacije HuD proteina, poput metilacije, inhibira vezanje HuD na RNA molekulu. Slučaj C prikazuje kompeticiju HuD s drugim RNA-vezujućim proteinima koji su pretežno destabilizirajući. Dio slučaja D prikazuje vezan HuD na specifični transkript čime ga štiti od razgradnje, dok drugi dio slučaja D prikazuje nevezan RNA-vezujući protein čime je RNA podložna razgradnji. Slučaj E prikazuje HuD vezan za specifični transkript u aksonskom brežuljku pri čemu tijekom transporta transkripta, HuD može stupiti u interakcije s regulatornim proteinima i drugim RNA-vezujućim proteinima (Preuzeto iz Furry- Deschenes i sur., 2006).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Postmortalni uzorci fetalnog moždanog tkiva čovjeka

Za analizu su korišteni postmortalni uzorci moždanog tkiva čovjeka tijekom ranog i srednje fetalnog razdoblja, koji su dio Zagrebačke neuroembriološke zbirke (Hrabač i sur., 2018), a za istraživanje postoje potrebna etička dopuštenja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U ovom diplomskom radu koristili su se koronarni i horizontalni presjeci moždanog tkiva izrezani na presjeke debljine 12-20  $\mu\text{m}$ , koji su korišteni za istraživanje metodama *in situ* hibridizacije i imunofluorescencije.



**Slika 4. Prikaz načina presjeka postmortalnog mozga čovjeka.** Slika a) prikazuje horizontalni presjek mozga pri čemu *anterior* označava prednji, a *posterior* stražnji dio mozga. Slika b) prikazuje koronarni presjek mozga dok slika c) prikazuje sagitalni odnosno uzdužni presjek hemisfere moždanog presjeka (Anonymous, 2018).

### 3.1.2. Korištene otopine i pribor u laboratoriju za *in situ* hibridizaciju

Mikrotom, laboratorijsko posuđe, pH metar, Xylol, 100 % EtOH, 96 % EtOH, 70 % EtOH, 50 % EtOH, proteinaza K, 50 mM pufera TRIS, dH<sub>2</sub>O, 20 % ledena octena kiselina, 1xMABT (eng. maleic acid buffer containing Tween 20), hibridizacijski pufer (100 % formamid-a, 20 % SSC (eng. saline sodium citrate), SS-DNA (eng. *salmon sperm*), tRNA izolirana iz pivskog kvasca), 50 mM TRIS, DEPC-H<sub>2</sub>O, 50 % dextransulfata, 50x denhardts reagensa, otopina za blokiranje (1xMABT, 2 % BSA pufera), dH<sub>2</sub>O, Na-citrat, prestaining pufer (1M TRIS (pH 9,5), 5M NaCl, 1M MgCl<sub>2</sub>), pufer za bojenje (TRIS, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, HCl), 50 % formamid + 2xSSC, 2xSSC

### 3.1.3. Korištena proba za *in situ* hibridizaciju

Proba korištena za *in situ* hibridizaciju je komercijalno nabavljena digoksinom-označena antisense *hElavl4*-pan-DIG (IDT), u smjeru 3' - 5' komplementarna ciljanjoj mRNA i sense proba korištena kao kontrola u smjeru 5' - 3' (prethodno korištene u radu Popovitchenko i sur., 2020).

### 3.1.4. Korišteno protutijelo za detekciju probe metodom *in situ* hibridizacije

Za *in situ* hibridizaciju koristilo se komercijalno dostupno anti-DIG-AP protutijelo.

### 3.1.5. Korišteni supstrati za *in situ* hibridizaciju

- NBT (Nitroblue tetrazolium)
- BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat)

### 3.1.6. Laboratorijski pribor i otopine za imunofluorescenciju

Mikrotom, laboratorijsko posuđe, pH metar, Xylol, 100 % EtOH, 96 % EtOH, 70 % EtOH, 1xPBS, citratni pufer (pH=6,0), citric acid monohidrat (limunska kiselina), 2M NaOH, otopina za blokiranje nespecifičnog vezanja (1 % BSA + 0,5 % TRITON X-100 u 1xPBS), quencher TrueBlack™ za suzbijanje autofluorescencije tkiva, pokrivalo koje sadrži DAPI (Vectashield with DAPI) ili bez DAPIja.

### 3.1.7. Primarna protutijela korištena za imunofluorescenciju

- anti-HuD, monoklonsko protutijelo, proizvedeno u mišu (Santa Cruz Biotechnology), u razrjeđenju 1:500
- anti-Fezf2, poliklonsko protutijelo, proizvedeno u zecu (Abcam) u razrjeđenju 1:50

### 3.1.8. Sekundarna protutijela korištena za imunofluorescenciju

- AlexaFluor AF555, (Thermo Fisher Scientific) pripremljeno u razrjeđenju 1:500
- AlexaFluor AF488, (Thermo Fisher Scientific) pripremljeno u razrjeđenju 1:1000

### 3.1.9. Uređaj korišten za analizu histoloških rezova

- Preparati tkiva su skenirani i analizirani korištenjem skenera visoke rezolucije za histološke preparate s fluorescentnom lampom, uređaj Hammamatsu NanoZoomer 2.0 RS.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. *In situ* hibridizacija (ISH) na moždanom tkivu čovjeka

*In situ* hibridizacija je metoda kojom se detektira specifična DNA ili RNA sekvenca od interesa te kojom se utvrđuje njihova lokalizacija na kromosomima ili ekspresija u pojedinim stanicama ili tkivu. *In situ* hibridizacija u histologiji nastoji vizualizirati željenu sekvencu u pojedinom tkivu, komplementarno sparenu s kratkom jednolančanom probom obilježena radioaktivnim ili neradioaktivnim molekulama. Radioaktivno označene probe se obilježavaju s izotopima poput  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ili  $^{125}\text{I}$  koje su pritom detektirane autoradiografijom. S druge strane, neradioaktivne probe dijele se na direktne i indirektne metode. Primjenom direktne metode, obilježena proba se može vizualizirati odmah nakon hibridizacije sa specifičnom sekvencom, tako što na sebi direktno ima vezane fluorescentne molekule (fluorofore). Indirektna metoda koristi obilježavanje probe s biotinom ili digoksigeninom (DIG) koje su pritom detektirane sa specifičnim protutijelom ili u slučaju biotina, streptavidinom. Neradioaktivno obilježene probe su se pokazale sigurnijima za rad i daju brže rezultate od radioaktivno obilježenih probi (Eisel i sur., 2008). U ovom diplomskom radu, koristila se

komercijalno dostupna cRNA proba označena neradioaktivnim DIG-om, prethodno korištena u publikaciji (Popovitchenko i sur., 2020). DIG je po svom kemijskom sastavu steroid koji je izoliran iz biljke *Digitalis purpurea*, a budući da je *Digitalis purpurea* jedini prirodni izvor DIG-a, korištenjem anti-DIG protutijela u moždanom tkivu čovjeka ne dolazi do vezanja ovog protutijela za ostale biološke materijale (Eisel i sur., 2008). Nakon hibridizacije probe sa specifičnom regijom *ELAVL4* mRNA molekula, proba se vizualizirala inkubacijom i vezanjem anti-DIG protutijela koji na sebi ima vezan enzim alkalnu fosfatazu. Alkalna fosfataza konvertira supstrate žute boje NBT i BCIP u plavo-ljubičastom bojom označene produkte. Obojeni preparati se vizualiziraju skeniranjem na uređaju Hammamatsu NanoZoomer 2.0 RS. *In situ* hibridizacijom smo nastojali vizualizirati produkt *ELAVL4* gena i time promatrati njegovu ekspresiju u privremenim fetalnim zonama stijenke fetalnog telencefalona: VZ, SVZ, IZ, SP, KP i MZ kako bi utvrdili distribuciju *ELAVL4* mRNA tijekom prenatalnog razvoja moždane kore čovjeka.

Kako bi se fiksiralo postmortalno tkivo, odnosno spriječila njegova autoliza, očuvala morfologija i zadržala imobiliziranost proteina i nukleinskih kiselina, bez utjecaja na staničnu strukturu, tkiva se fiksiraju u 4 % paraformaldehidu te zatim ugrađuju u parafinske blokove kako bi se mogla koristiti za eksperimente. Parafin održava čvrstoću tkiva i omogućuje čuvanje preparata na sobnoj temperaturi do ekperimentalne analize. Preparati se pomoću mikrotoma režu na tanke presjeke od 12 do 20  $\mu\text{m}$ , a nakon obilježavanja vrste i broja uzorka na predmetnim stakalcima slijedi deparafinizacija. Deparafinizacijom se postiže uklanjanje parafina iz tkiva te hidratacija moždanog tkiva. U prvom koraku deparafinizacije, tkiva se uranjaju u Xylol uz tri izmjene po 3 minute, a nakon toga se histološki rezovi tretiraju silaznim slijedom alkohola etanola u četiri različite koncentracije: 100 % EtOH 2x5 minuta, 96 % EtOH 1x5 minuta, 70 % EtOH 1x3 minuta i 50 % EtOH 1x5 minuta. Nakon deparafinizacije je uslijedio tretman proteinazom K. Tijekom pripreme proteinaze K, preparati su se ispirali u tekućoj vodi. Proteinaza K razgrađuje ciljne proteine vezane na nukleinsku kiselinu kako bi se osigurala pristupačnost RNA molekule. Međutim, proteinaza K ponekad može pridonijeti lažno pozitivnim rezultatima budući da može razoriti stanice i tkiva, te je stoga bitno prilagoditi koncentraciju i vrijeme trajanja digestije. Preparati su tretirani s 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  proteinaze K u prethodno zagrijanom 50 mM TRIS puferu na 37 °C u vremenu od 10 minuta. Nakon tretmana proteinazom K, uslijedilo je ispiranje u dH<sub>2</sub>O u trajanju od 5x1 minuta. Kako bi se postigla permeabilizacija stanične membrane, za ulazak probe i protutijela u stanicu, histološki rezovi su se zatim 20 sekundi tretirali 20 %-tnom ledenom octenom kiselinom. Nadalje, za dehidraciju moždanog tkiva ponovno je uslijedilo ispiranje u uzlaznim koncentracijama etanola u vremenu od po 1 minute: 70 % EtOH, 95 % EtOH i 100 % EtOH nakon čega su se preparati 20 minuta sušili na zraku. Nakon sušenja preparata, uslijedio je korak

prehibridizacije kako bi se RNA proba mogla vezati na specifičnu mRNA. Korak prehibridizacije uključuje tretiranje preparata hibridizacijskim puferom na povišenoj temperaturi od 58 °C. Hibridizacijski pufer sadrži 25 mL 100 % formamid-a, 10 mL 20 % SSC-a, 1 mL SS-DNA i 200 µL tRNA izoliranog iz pivskog kvasca. Formamid svojim djelovanjem stabilizira jednolančane RNA inaktivirajući RNAaze. Smjesa se nadopunila do 40 mL sa DEPC-H<sub>2</sub>O, nakon čega se dodalo 5 mL 50 % dextransulfata i 1 mL 50x denhardtts reagensa gdje se ponovno s DEPC-H<sub>2</sub>O otopina nadopunila do 50 mL. Otopina DEPC-H<sub>2</sub>O se dobila miješanjem 1000 mL dH<sub>2</sub>O i 1 mL DEPC-a. Nadalje, 20 % SSC se pripremio odvagom 87,65 g NaCl i 44,1 g Na-citrata koji su se pomiješali s 400 mL dH<sub>2</sub>O a potom se pomoću pH metra pH podesio na 7,0-7,2. Otopina se zatim nadopunila do 500 mL dH<sub>2</sub>O i 0,5 mL DEPC-a i potom autoklavirala. 50 % Dextransulfata se miješanjem 10 g Dextransulfata (bez RNAaze) i 10 mL DEPC-dH<sub>2</sub>O dobilo otapanjem na 50 °C, dok se 1 mL SS-DNA (10 mg mL<sup>-1</sup>) 5 minuta kuhalo, stavilo u led i potom u otopinu. Tijekom hibridizacije, SS-DNA i tRNA služe kao blokirajući agensi kako bi se smanjilo nespecifično vezanje probe. Nakon pripreme svih potrebnih otopina, svaki uzorak tkiva je tretiran sa 100 µL hibridizacijskog pufera te su uzorci pritom inkubirani jedan sat na 58 °C u hibridizacijskoj peći. Tijekom inkubacije uzorka, pripremljena je proba tako što je 10 ng mL<sup>-1</sup> digoksinin-označene anti-sense *hElavl4*-pan-DIG (IDT) ili sense probe razrijeđeno 1000x u hibridizacijskom puferu nakon čega su PCR tube zagrijane 2 minute na 95 °C kako bi se dogodila denaturacija RNA. Konačno, korak hibridizacije je izvršen dodatkom 50-100 µL razrijeđene probe na svaki uzorak te su uzorci ostavljeni na 58 °C preko noći.

Sljedeći dan uslijedilo je ispiranje: u prvom koraku ispiranja, kako bi se uklonio višak probe i hibridizacijski pufer, preparati su ispirani u 50 % formamid-u, uz 2xSSC-u po tri izmjene u periodu od 5 minuta na 55 °C. Drugim ispiranjem smo uklonili nespecifično vezane RNA molekule kako bi se smanjio pozadinski signal, tako što su se histološki rezovi tretirali u 2xSSC na 45 °C uz tri izmjene po 5 minuta. Potom je uslijedilo ispiranje u 1xSSC, 3x5 minuta, a zatim su se preparati isprali u 1xMABT na 45 °C po 3x5 minuta. MABT omogućuje bolju detekciju nukleinskih kiselina. Tijekom 20 minuta sušenja preparata na zraku, pripremila se blokirajuća otopina. Blokirajuća otopina sadržavala je 1xMABT i 2 % BSA pufera, a nakon nakapavanja preparata, uslijedilo je blokiranje nespecifičnih protutijela 1,5 sat na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uslijedilo je nakapavanje anti-DIG protutijela u razrijeđenom blokingu koncentracije 1:1500 te su preparati ostavljeni na +4 °C, preko noći. Histološki rezovi su sljedeći dan isprani u 1xMABT uz tri izmjene po 10 minuta, a za vrijeme ispiranja pripremio se prestaining pufer koji sadržava 10 mL 1M TRIS (pH 9,5), 5 mL 1M MgCl<sub>2</sub> te 2 mL 5M NaCl. Nakon tretiranja preparata sa prestaining puferom uz tri izmjene od 10 minuta, uslijedio je tretman puferom za bojanje (0,16 g TRIS, 0,06 g NaCl, te 0,01 g MgCl<sub>2</sub> čime se pH podesio na 9,0



i otopina nadopunila do 10 mL s dH<sub>2</sub>O). U 1 mL pripremljenog pufera se zatim dodao supstrat NBT i BCIP, prema uputama proizvođača, nakon čega se pripremljena otopina nakapavala na preparate te inkubirala u mraku. Uslijedila je kromogena reakcija koja je trajala 30 min nakon čega su se preparati isprali s dH<sub>2</sub>O i 30 min sušili na zraku.

### 3.2.2. Imunofluorescencija (IF) na moždanom tkivu čovjeka

Imunofluorescencija (IF) je često korištena metoda kojom se lokaliziraju ciljni antigeni u određenom tkivu, u ovom slučaju, postmortalnom tkivu mozga. IF omogućuje intenzivan signal čime se postiže bolja detekcija specifičnog antigena. Metodom imunofluorescencije se analizirala lokalizacija HuD proteina u privremenim fetalnim zonama stijenke fetalnog telencefalona. Za početak, tkivo korišteno za analizu se trebalo fiksirati da bi se zadržala imobiliziranost antigena, bez utjecaja na staničnu strukturu. Nadalje, fiksacijom se postiže imunoreaktivnost specifičnog epitopa koji stupa u interakciju sa specifičnim protutijelom. Za očuvanje tkiva, fiksirana tkiva se ugrađuju u parafin i čuvaju na sobnoj temperaturi do eksperimentalne analize (Kyuseok i sur., 2019). Preparati se pomoću mikrotoma režu na tanke presjeke od 12 do 20 μm nakon čega slijedi deparafinizacija.

Deparafinizacija uključuje uranjanje tkiva u Xylol uz dvije izmjene po 10 minuta, a nakon čega se histološki rezovi tretiraju silaznim slijedom alkohola etanola: 100 % EtOH 2x5 minuta, 96 % EtOH 2x5 minuta i 70 % EtOH 1x5 minuta. Nadalje, slijedi ispiranje preparata u 1xPBS u vremenu od 10 minuta. Za vrijeme ispiranja, pripremi se citratni pufer tako što se odvaže 2,1 gram limunske kiseline koja se zatim pomiješa s 900 mL destilirane H<sub>2</sub>O. Smjesa se potom miješa na magnetskoj miješalici i istovremeno podešava na željenu pH vrijednost (pH=6). Nakon pripreme slijedi iskuhavanje preparata u citratnom puferu čime se omogućuje otvaranje epitopa kako bi se anti-HuD protutijelo moglo vezati za ciljani protein. Iskuhavanje podrazumijeva zagrijavanje u mikrovalnoj pećnici na 700W te se unutar tog vremena dokapava par kapi destilirane H<sub>2</sub>O kako bi se smanjilo ključanje. Zatim se citratni pufer ponovno stavi na 350W u mikrovalnu pećnicu na 20 minuta te u tom vremenu također nadodaju par kapi destilirane vode. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi od 30 minuta, slijedi ispiranje u 1xPBS uz tri izmjene po 10 minuta. Za vrijeme ispiranja, potrebno je pripremiti otopinu za blokiranje nespecifičnih antigena koji se vežu za sve proteine u tkivu tzv. otopina za blocking, koja sadrži 1 % BSA, 0,5 % TRITON-a X-100 u 1xPBS. Bitno je naglasiti da je svrha PBS-a održavanje pH staničnog okoliša, dok Triton predstavlja detergent koji omogućuje permeabilnost membrane kako bi BSA proteini mogli ući u stanicu. Nakon nakapavanja, otopina blockinga na preparatima se inkubira 1-2 sata na sobnoj temperaturi.

Metoda imunofluorescencije (IF) podrazumijeva primjenu jednu od dvije metode IF: direktnu ili indirektnu. Direktna IF primjenjuje direktnu konjugaciju fluorofora na primarnom protutijelu koje stupa u interakciju sa specifičnim antigenom, dok indirektna IF primjenjuje najprije vezanje primarnog protutijela za specifični antigen a zatim fluoroforom obilježeno sekundarno protutijelo prepoznaje i konjugira s primarnim protutijelom (Kyuseok i sur. 2019). U ovom diplomskom radu koristila se indirektna metoda IF. Nakon inkubacije preparata u blokirajućoj otopini na sobnoj temperaturi, slijedi aplikacija primarnog protutijela u istoj otopini. Komercijalno dostupna protutijela su razrijeđena i primjenjena u različitim koncentracijama: anti-HuD u razrjeđenju 1:500 te anti-Fezf2 u razrjeđenju 1:50. Nakon apliciranja primarnih protutijela na histološke rezove, preparati se inkubiraju preko noći na +4 °C u poklopljenoj vlažnoj komori.

Sljedeći dan, rezovi se ispiru u 1xPBS (3x10 min) nakon čega slijedi reakcija u mraku koja podrazumijeva inkubaciju fluorescentnih protutijela u otopini za blocking. U ovom diplomskom radu koristila su se komercijalno dostupna sekundarna AlexaFluor protutijela: AF555 (fluorescira crvenom bojom), te AF488 (fluorescira zelenom bojom). Nakon inkubacije od 2h na sobnoj temperaturi, slijedi ponovno ispiranje histoloških rezova u 1xPBS u trajanju od 3x10 minuta. Zatim su se za suzbijanje autofluorescencije preparati nakapali s otopinom quencher TrueBlack™. Preparati se nakon dokapavanja ponovno ispiru u 1xPBS uz tri izmjene po 10 minuta, a nakon toga slijedi pokrivanje preparata pokrivalom sa DAPIjem (Vectashield with DAPI).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti prenatalnu ekspresiju *ELAVL4* gena čija je uloga u razvoju piramidnih neurona tijekom razvoja mozga prethodno pokazana. Koristeći metode *in situ* hibridizacije (ISH) i imunofluorescencije (IF) analizirali smo ekspresijski obrazac *ELAVL4* mRNA i njegova konačnog produkta ekspresije, proteina HuD, u privremenim fetalnim zonama stijenke fetalnog telencefalona tijekom prenatalnog razvoja moždane kore čovjeka od 10. do 21. tjedna nakon začeća.

Specifični ciljevi:

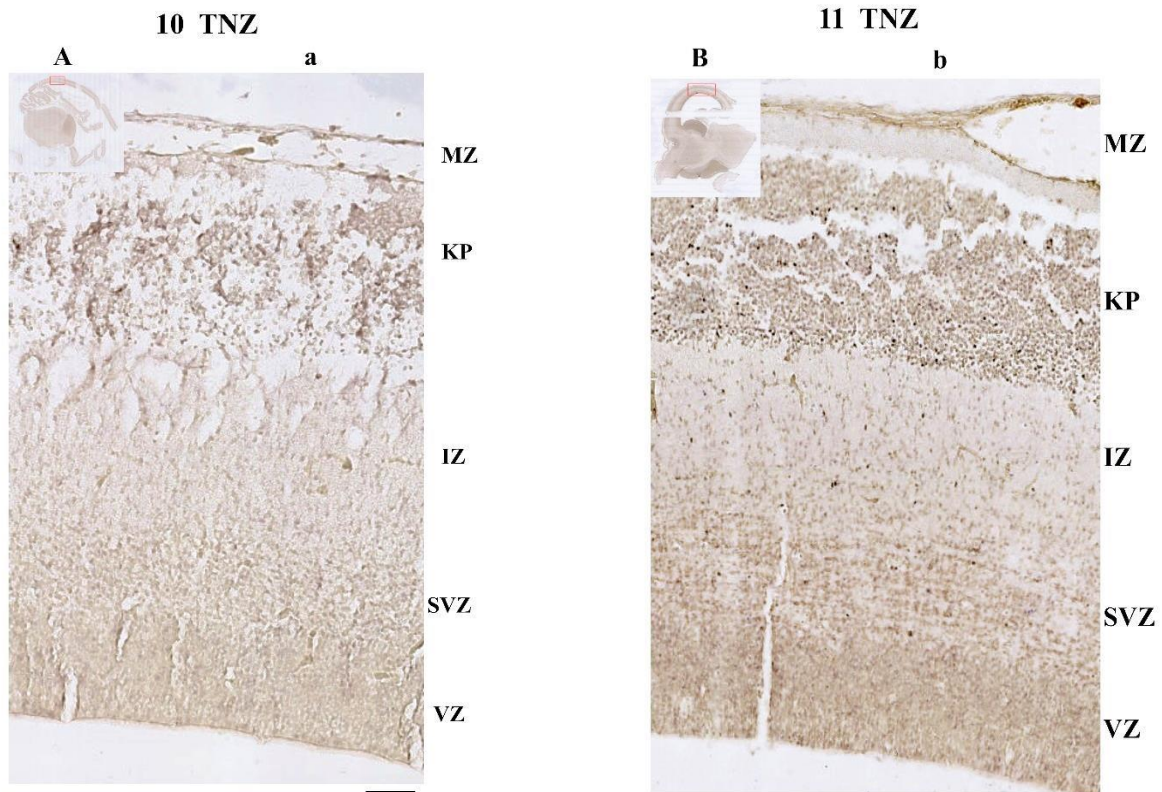
- Metodom *in situ* hibridizacije analizirati obrazac ekspresije mRNA *ELAVL4* gena u privremenim fetalnim zonama stijenke telencefalona: VZ, SVZ, IZ, SP, KP i MZ tijekom fetalnog razdoblja razvoja moždane kore čovjeka.
- Metodom imunofluorescencije prikazati obrazac ekspresije RNA-vezujućeg proteina HuD u stanicama privremenih fetalnih zona tijekom ranog i srednje fetalnog razvoja moždane kore pomoću komercijalno dostupnog protutijela anti-HuD.

### 4.1. Analiza *in situ* hibridizacije *ELAVL4* produkta tijekom prenatalnog razvoja moždane kore čovjeka

Nakon provođenja metode *in situ* hibridizacije, uspješno je prikazana distribucija mRNA molekula *ELAVL4* gena na koronarnim i horizontalnim presjecima kroz moždane hemisfere tijekom ranog i srednje fetalnog razdoblja. Rezultati su vizualizirani pomoću skenera Hammamatsu NanoZoomer 2.0 RS, uređaja koji omogućuje analizu histoloških preparata pretvarajući ih u digitalne slike visoke rezolucije. Skenirane slike preparata su potom analizirane u NDP.view2 programu koji omogućuje pregled slika mikroskopske rezolucije.

RNA proba označena DIGom se veže za eksprimirane mRNA molekule *ELAVL4* gena. Rezultati istraživanja prikazani na slici 5 prikazuju ekspresiju mRNA *ELAVL4* gena u ranom fetalnom razdoblju tijekom 10. i 11. TNZ pri čemu je tijekom 10. TNZ mRNA *ELAVL4* gena detektirana manje intenzivnim signalom u formiranoj VZ, SVZ, IZ i KP dok u MZ signal nije vidljiv. U 11. TNZ signal je jače intenzivan, posebice u IZ i KP što se može uočiti usporedbom slika a i b. U VZ također dolazi do pojačane ekspresije *ELAVL4* mRNA, gdje se odvija proliferacija matičnih stanica progenitora koje prolaze svoju zadnju mitotičku diobu. Nakon zadnje mitotičke diobe u VZ, stanice migriraju prema

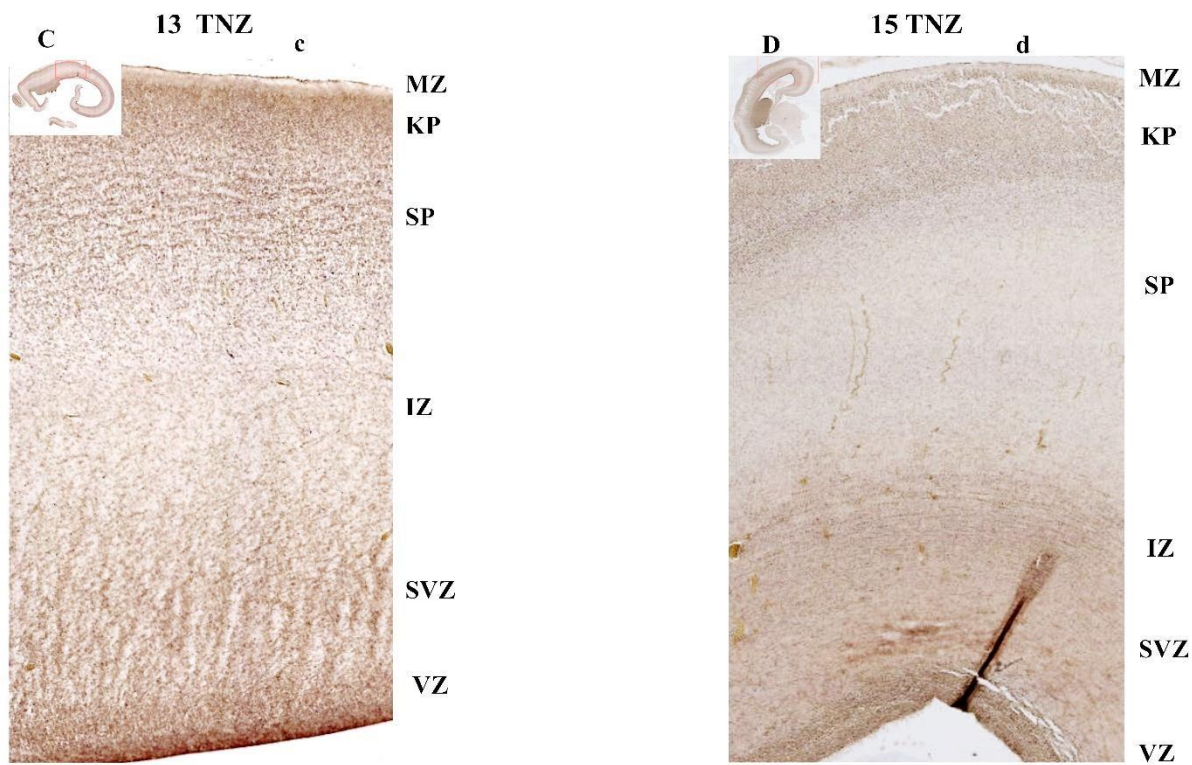
pijalnoj površini i putuju do svog konačnog odredišta. SVZ također predstavlja zonu proliferacije te se u stanicama prikazanim na slici 5 može uočiti slabije intenzivan signal mRNA *ELAVL4* gena. Tijekom ranog fetalnog razvoja u stijenci fetalnog telencefalona prisutne su sljedeće fetalne zone: VZ, SVZ, IZ, KP i MZ.



**Slika 5.** Obrazac ekspresije mRNA *ELAVL4* gena na koronarnom presjeku kroz moždane hemisfere čovjeka u 10. i 11. TNZ. Slika A prikazuje koronarni presjek moždane hemisfere u 10. TNZ dok je označeni dio prikazan crvenom bojom uvećan na slici a. Mjerilo: 500  $\mu\text{m}$ . Slika a prikazuje uvećan prikaz lijeve moždane hemisfere i prikaz privremenih fetalnih zona u prenatalnom razvoju čovjeka (mjerilo 100  $\mu\text{m}$ ). Slika B prikazuje koronarni presjek desne moždane hemisfere u 11. TNZ (mjerilo 500  $\mu\text{m}$ ) dok slika b prikazuje uvećani prikaz desne moždane hemisfere u 11. TNZ u prenatalnom razvoju čovjeka (mjerilo 100  $\mu\text{m}$ ). VZ: ventrikularna zona, SVZ: subventrikularna zona, IZ: intermedijalna zona, KP: kortikalna ploča, MZ: marginalna zona.

Srednje fetalno razdoblje obilježava pojava prominentne SP zone između 12.5 i 15. TNZ pri čemu stanice počinju eksprimirati molekularne markere uključene u proces sinaptogeneze. Povećanje volumena SP zone je uvjetovano povećanim volumenom izvanstaničnog matriksa (eng. extracellular matrix, ECM) i povećanim brojem aksona koji prolaze kroz tu zonu. Dolazi do intenzivnog povećanja broja postmitotskih stanica, koje pužu uz radijalnu gliju i migriraju prema pijačnoj površini do konačnog odredišta. Povećanje gustoće stanica dovodi do zadebljanja slojeva buduće moždane kore odraslog mozga (Judaš i Kostović, 2015). SP sadrži heterogene subpopulacije stanica, uključujući glutamatergičke neurone koji su doputovali radijalnom migracijom iz germinalne zone, te interneurone, nastali iz stanica progenitora bazalnog telencefalona (Bystron i sur. 2008).

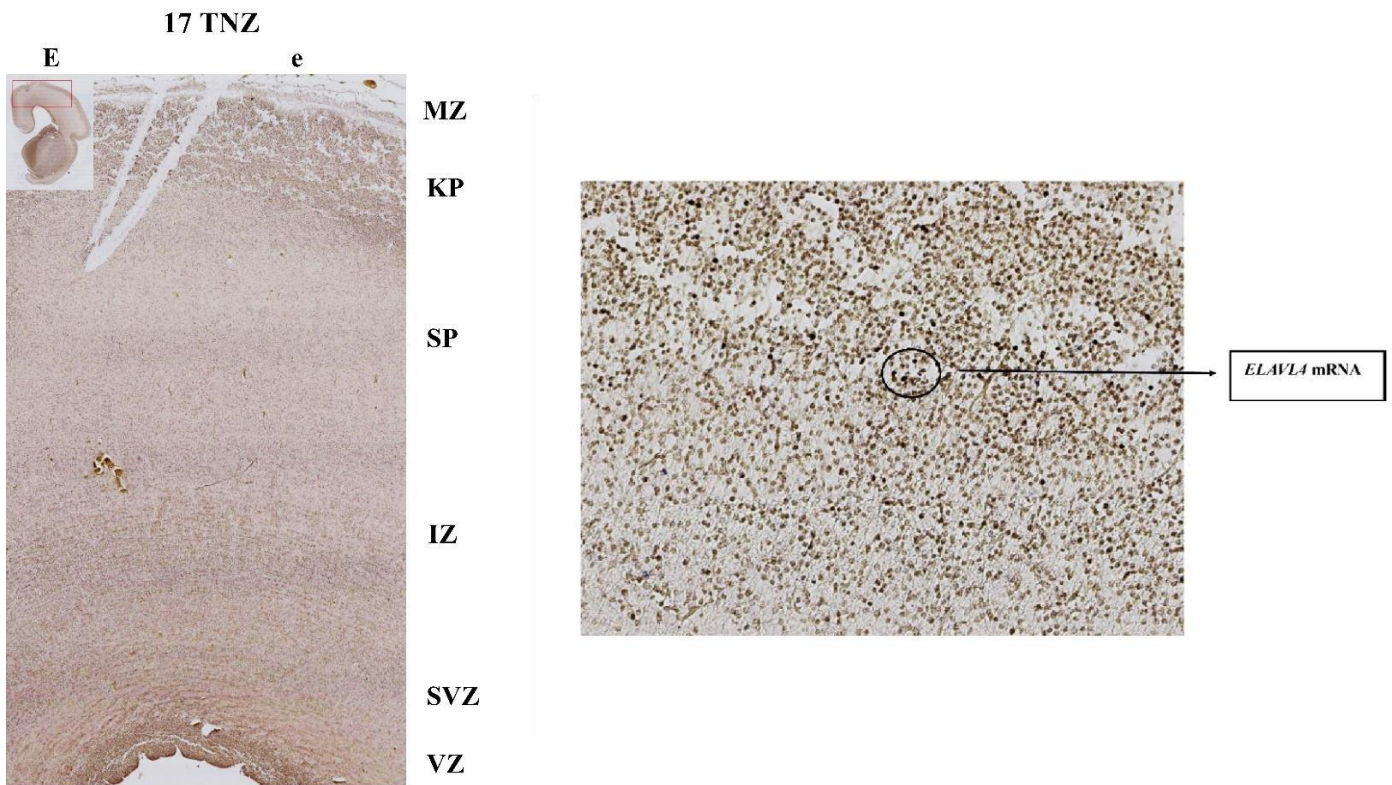
Histološki rezovi obilježeni HuD-DIG RNA probom tijekom 13. i 15. TNZ na slici 6 pokazuju intenzivniji signal u usporedbi s ranim fetalnim razdobljem. Kao produkt NBT/BCIP reakcije, plavom bojom obilježene mRNA *ELAVL4* gena mogu se uočiti u stanicama svih privremeno fetalnih zona: VZ, SVZ, IZ, SP, KP i MZ pri čemu se u KP uočava najveća zbijenost i gustoća obilježenih stanica. Nadalje, tijekom 13. TNZ, SP predstavlja jako tanak sloj koji se već tijekom 15. TNZ zadebljava, što ukazuje na povećan broj stanica u toj zoni, pri čemu neki neuroni formiraju sinapse i sintetiziraju neurotransmitere, dok drugi još putuju do konačnog odredišta u budućoj moždanoj kori, a neki se neuroni još nisu ni rodili.



**Slika 6.** Prikaz distribucije mRNA *ELAVL4* gena na koronarnom presjeku moždane hemisfere tijekom 13. i 15. TNZ. Tijekom 13. TNZ na slici C prikazan je presjek kroz moždanu hemisferu (mjerilo 500 µm). Na slici c uvećano je prikazana distribucija mRNA *ELAVL4* gena u privremenim fetalnim zonama. Mjerilo: 100 µm. Tijekom 15. TNZ na slici D prikazan je koronarni presjek kroz desnu moždanu hemisferu. Mjerilo: 500 µm. Slika d uvećano prikazuje ekspresiju mRNA *ELAVL4* gena u privremenim fetalnim zonama (mjerilo 100 µm). VZ: ventrikularna zona, SVZ: subventrikularna zona, IZ: intermedijalna zona, SP: subplate zona, KP: kortikalna ploča, MZ: marginalna zona.

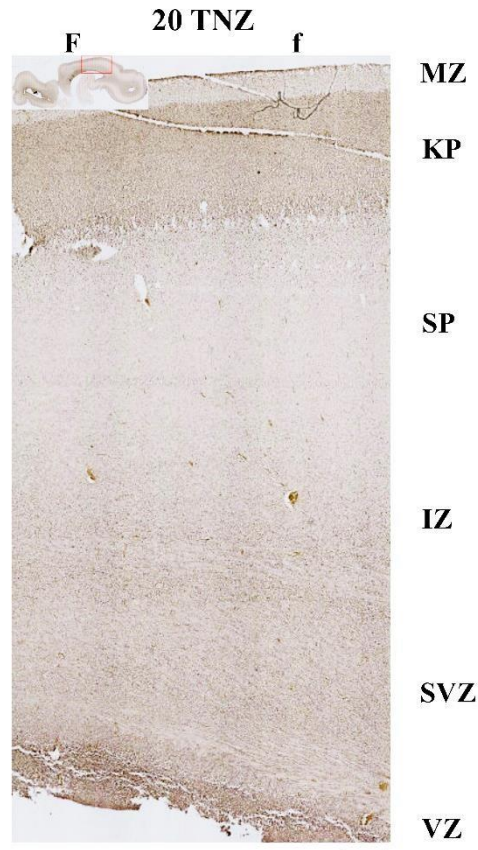


U 17. TNZ signal je uočen u svim slojevima buduće moždane kore: VZ, SVZ, IZ, SP, KP i MZ. Signal obilježenih stanica je intenzivan u svim zonama, a posebice u SP i KP. Obilježene stanice *ELAVL4* mRNA su također distribuirane i u VZ i SVZ.



**Slika 7.** Koronarni prerez tkiva moždane hemisfere u 17. TNZ pri čemu se vidi prikaz stanica obilježene metodom *in situ* hibridizacije. Koronarni presjek moždane hemisfere prikazuje *ELAVL4* mRNA molekule eksprimirane u svim privremeno fetalnim zonama (VZ, SVZ, IZ, SP, KP, MZ) (Slika F i f) Desna slika prikazuje znatno uvećane slojeve SP i KP pri čemu se jasno vide plavo-ljubičasto obojene stanice označene strelicom i kružićem. Mjerilo: 200  $\mu\text{m}$ .

Na histološkim rezovima tijekom 20. TNZ signal je najintenzivniji u KP, kao i u IZ i SP. Slika 8 prikazuje ekspresijski obrazac *ELAVL4* mRNA pri čemu se najjači intenzitet vidi u KP.



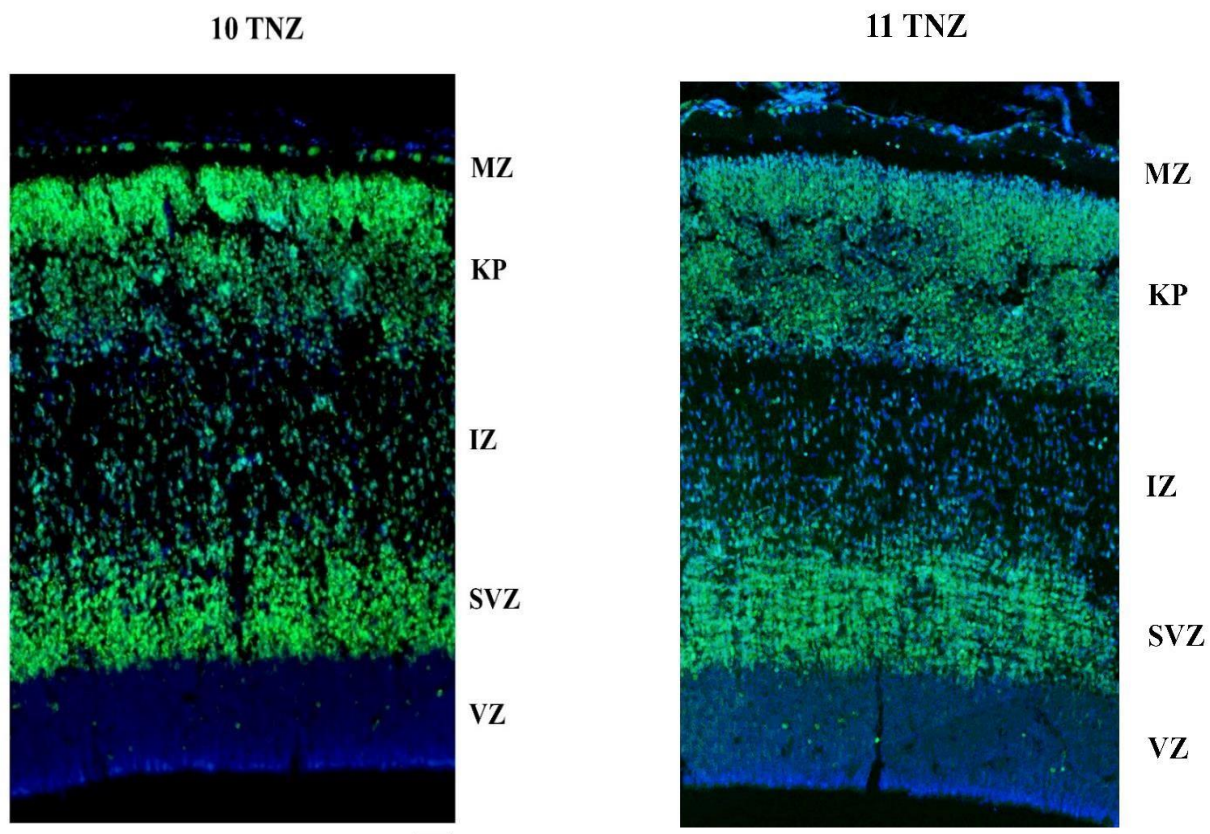
**Slika 8.** Obrazac ekspresije *ELAVL4* mRNA u 20. TNZ na horizontalnom presjeku desne moždane hemisfere. Slika E prikazuje horizontalni presjek kroz moždanu hemisferu. Slika e prikazuje uvećan prikaz privremenih fetalnih zona (VZ, SVZ, IZ, SP, KP, MZ) slike E. Mjerilo: 200  $\mu$ m



#### 4.2. Imunofluorescencijska analiza proteina HuD tijekom prenatalnog razvoja moždane kore čovjeka

Korištenjem imunofluorescencije smo pokazali obrazac ekspresije proteina HuD u moždanoj kori čovjeka od 10. do 21. TNZ. Nakon vezanja primarnog protutijela na antigen HuD, aplicirala su se sekundarna protutijela AlexaFluor 488 koje vezanjem na primarno protutijelo fluoresciraju zelenom bojom. Time se detektirao i analizirao zeleni signal u privremenim fetalnim zonama tijekom ranog i srednjeg fetalnog razdoblja. Bitno je napomenuti da se kao kontrola koristio DAPI. DAPI ima sposobnost prolaska kroz staničnu i jezgrinu membranu gdje se pritom veže na dvolančanu DNA, odnosno par baza A-T (adenin-timin). Korištenjem svjetlosti koje apsorbira DAPI valne duljine od 358 nm dolazi do plavog obojenja jezgri stanica. DAPI-jem je omogućena vizualizacija rasporeda stanica tijekom traženja željenog signala. Nakon provedene metode imunofluorescencije, preparati su analizirani na skeneru visoke rezolucije, Hammamatsu NanoZoomer 2.0 RS u NDP.view2 programu.

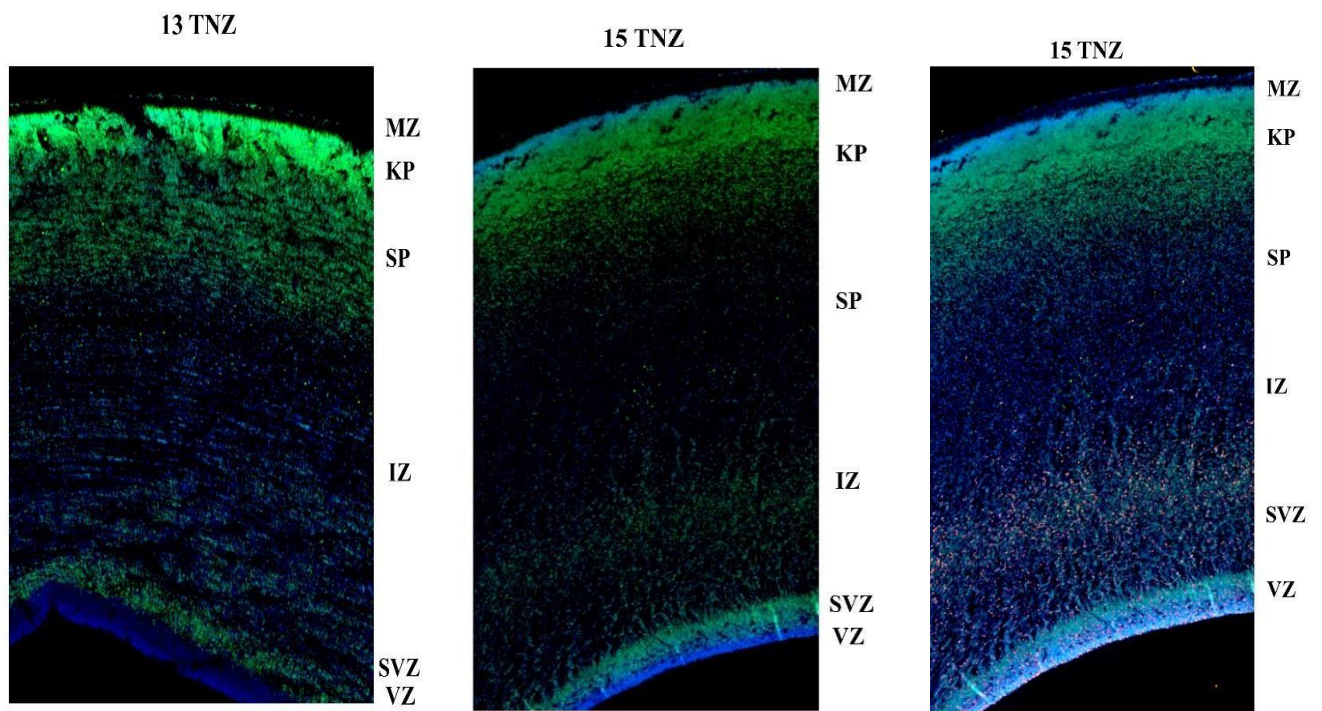
Tijekom ranog fetalnog razdoblja, 10. i 11. TNZ na koronarnom presjeku kroz moždane hemisfere vide se pet formiranih privremenih fetalnih zona: VZ, SVZ, IZ, KP i MZ (slika 9). Uočena je zadebljana proliferativna zona VZ, dok postmitotički neuroni migriraju iz VZ prema pijačnoj površini. U 10. TNZ antigen HuD pokazuje najintenzivniju imunoreaktivnost u SVZ i KP, pri čemu su stanice gusto zbijene, dok je imunoreaktivnost manje intenzivna u MZ i IZ. U VZ nije zabilježena reaktivnost što je prikazano na slici 9. U 11. TNZ imunoreaktivnost proteina HuD (obilježen zeleno) se također uočava u SVZ i KP, ali nije zabilježena reaktivnost u VZ. U IZ imunoreaktivnost je manje intenzivna, pri čemu se uočava plavi signal što označava jezgre stanica obojene DAPIjem.



**Slika 9.** Obrazac ekspresije antigena HuD u privremenim fetalnim zonama moždane kore tijekom 10. i 11. TNZ. Plava boja obilježava DAPIjem obojene stanice. Zelena boja vizualizira antigen HuD u privremenim fetalnim zonama. Oznake: VZ: ventrikularna zona, SVZ: subventrikularna zona, IZ: intermedijalna zona, KP: kortikalna ploča, MZ: marginalna zona. Mjerilo: 200  $\mu\text{m}$ .

13. i 15. TNZ se ubrajaju u srednje fetalno razdoblje u kojem dolazi do razvoja SP. Na preparatu 13. TNZ, najintenzivnija imunoreaktivnost HuD proteina se uočava u KP, kao i u SP i SVZ. Kroz IZ uočavaju se rijetko raspoređene stanice s pojedinim intenzivnijim signalom (slika 10). U 15. TNZ vidi se imunoreaktivnost u prominentnom sloju SP, uz intenzivnu imunoreaktivnost u KP i SVZ.

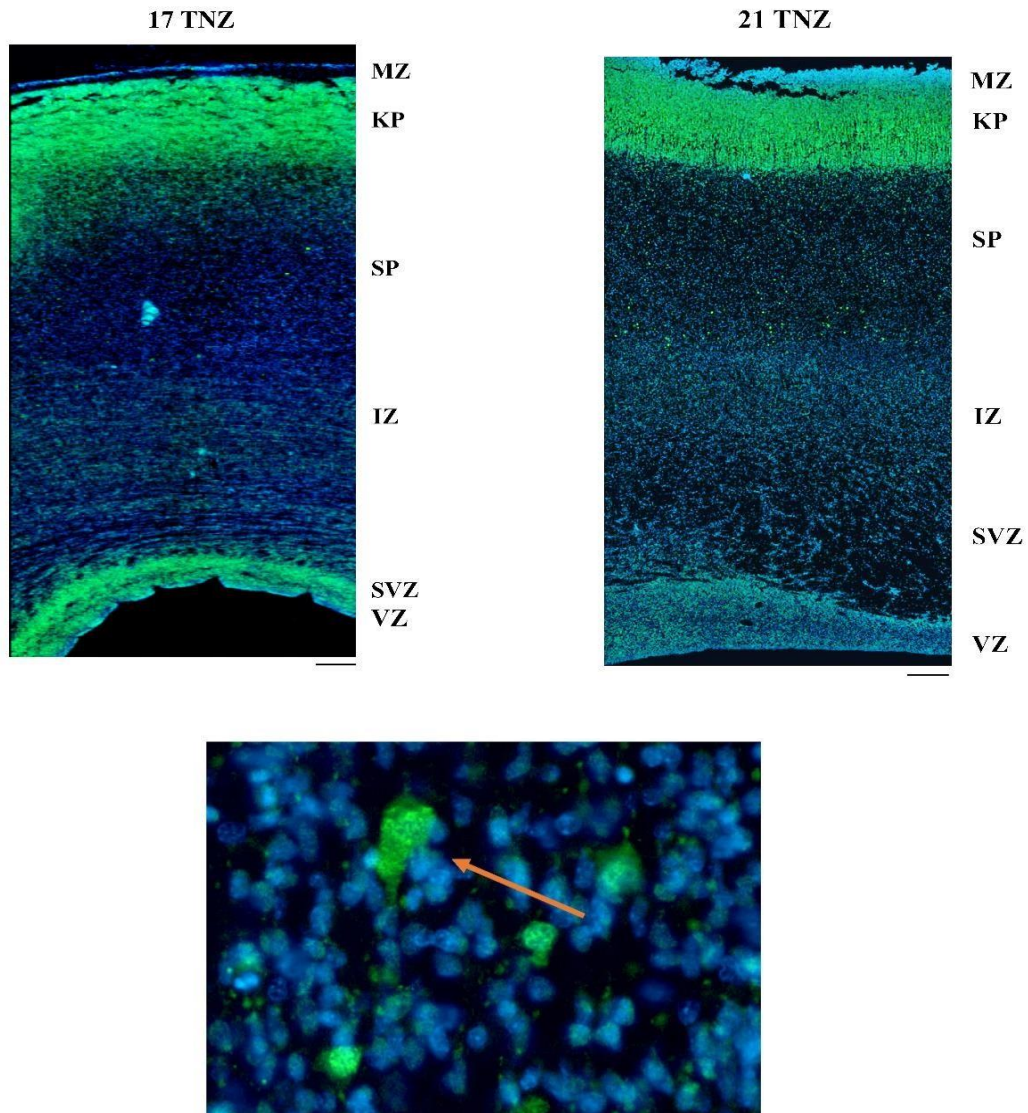
Osim za analizu obrasca ekspresije određenog proteina, imunofluorescencijska metoda se može koristiti i za utvrđivanje kolokalizacije dvaju ili više eksprimiranih proteina u stanici korištenjem metode dvostrukog imunofluorescencijskog bojenja. Ukoliko su se aplicirana protutijela vezala za dva antigena unutar iste stanice doći će do kolokalizacije fluorescencijskog signala. Crveni signal distribuiran u gornjem sloju SVZ (slika 10) prikazuje marker Ki67 koji se koristi za obilježavanje proliferativnih stanica.



**Slika 10.** Koronarni prikaz reza kroz moždane hemisfere tijekom srednjeg fetalnog razdoblja 13. i 15. TNZ. Zelena boja prikazuje obrazac ekspresije proteina HuD. Plava boja prikazuje stanice obilježene nuklearnim markerom DAPI. Crvena boja prikazuje stanice obilježene proliferativnim markerom Ki67. Mjerilo: 200  $\mu$ m.

U 17. TNZ imunofluorescencijski signal antigena HuD je u SP je vrlo slabo izražen, za razliku od VZ, SVZ, IZ i KP gdje je imunoreaktivnost intenzivnija.

U 21. TNZ došlo je do smanjenja imunoreaktivnosti u proliferativnim VZ i SVZ zonama. Signal je također izrazito reduciran u MZ, SP i IZ, dok je ekspresija RBP HuD i dalje znatno eksprimirana u KP.



**Slika 11.** Obrazac ekspresije proteina HuD na koronarnom presjeku kroz moždanu hemisferu tijekom 17. TNZ i na horizontalnom presjeku kroz moždanu hemisferu u 21. TNZ. Donja slika prikazuje uvećan prikaz migrirajućih stanica u SP zoni pri čemu je narančastom strelicom označen neuron. Mjerilo: 200  $\mu\text{m}$ .



#### 4.3. Obrazac ekspresije *ELAVL4* mRNA i ELAVL4 tijekom prenatalnog razvoja moždane kore

Razvoj moždane kore obuhvaća niz histogenetskih procesa uključujući proliferaciju i migraciju neurona, diferencijaciju i sazrijevanje neurona u specifičan morfološki i molekularni fenotip, citoarhitektonsku agregaciju specifičnih subpopulacija neurona, sinaptogenezu, gliogenezu, te mijelinizaciju. Tijekom prenatalnog razdoblja histogenetski procesi se vremenski i prostorno preklapaju što omogućuje razvoj kortikalne laminacije (Kostović i Judaš, 2015). Stoga, embrionalno i fetalno razdoblje mozga predstavlja kritičan period za nastajanje i organizaciju moždane kore. Kortikogeneza je strogo regulirana genskom ekspresijom, uključujući regulaciju transkripcije, translacije, te epigenetske čimbenike. Post-transkripcijska regulacija ima ključnu ulogu u regulaciji razvoja korteksa (Lennox i sur., 2017). U post-transkripcijske mehanizme spada aktivnost RNA-vezujućeg proteina odnosno antigena Hu (HuD), uključenog u sazrijevanje neurona te rast aksona. Iako je djelomično poznata uloga ovog RBP proteina, još uvijek se ne znaju svi mehanizmi djelovanja ovog proteina tijekom prenatalnog razvoja.

*In situ* hibridizacijom smo pokazali obrazac ekspresije *ELAVL4* mRNA u moždanoj kori tijekom prenatalnog razdoblja. Dobiveni podaci ovog diplomskog rada prikazuju dinamične promjene u ekspresiji *ELAVL4* mRNA između 10. i 20. TNZ. Prikazane slike (poglavlje 4.2) prikazuju intenzivnu ekspresiju mRNA *ELAVL4* gena između 13. i 17. TNZ što je u skladu s dobivenim rezultatima nedavno objavljene studije (Popovitchenko i sur. 2020).

Metodom imunofluorescencije je prikazan obrazac ekspresije željenog antigena HuD tijekom ranog i srednje fetalnog razdoblja u periodu između 10. i 21. TNZ. Detekcija rezultata je dala uvid u ekspresijski obrazac ovog proteina u privremenim fetalnim zonama. Dobiveni rezultati prikazuju da je tijekom 10. i 11. TNZ HuD imunoreaktivnost najintenzivnija u SVZ i KP, dok je tijekom 13. i 15. TNZ osim u SVZ, SP i KP slaba imunoreaktivnost vidljiva i u VZ. 17. TNZ intenzivna imunoreaktivnost je zabilježena osobito u VZ, a tijekom 21. TNZ dolazi do redukcije signala u svim zonama, osim u KP.

Rezultati ovog diplomskog rada pokazali su da se obrazac ekspresije *ELAVL4* mRNA i ELAVL4 u analiziranim privremenim fetalnim zonama tijekom različitih TNZ razlikuje. Ekspresija ELAVL4 je znatno povećana u VZ u kasnijim fazama neurogeneze, tijekom 17. i 21. TNZ, dok tijekom ranijeg stadija razvoja (10., 11., 13. i 15. TNZ) nije zabilježena reaktivnost ili je zabilježena vrlo niska razina. S druge strane, ekspresija *ELAVL4* mRNA se pokazala eksprimiranom u VZ tijekom cijelog perioda ranog i srednjeg fetalnog razdoblja. Također, obrazac ekspresije ELAVL4 u SVZ i KP je znatno povećan tijekom ranijeg razvoja iako je i tijekom 17. i 21. TNZ prisutan signal. Obrazac ekspresije

proteina HuD je ostao relativno isti u IZ i SP tijekom svih analiziranih faza razvoja. Nadalje, analiza *in situ* hibridizacije prikazuje ekspresiju *ELAVL4* mRNA čija je najveća ekspresija potvrđena između 13. i 17. TNZ u svim privremeno fetalnim zonama, a posebice u KP. U rano fetalnom razdoblju tijekom 10. i 11. TNZ, najveća ekspresija se javila u VZ, SVZ, IZ i KP koja je tijekom srednje fetalnog razvoja ostala relativno nepromjenjena. Analizom rezultata može se utvrditi da iako je *ELAVL4* mRNA eksprimirana, u pojedinim fazama razvoja mozga nije došlo do njene potpune ekspresije zbog translacijske represije. Popovitchenko i sur. 2020 su prikazali da je CELF1 protein odgovoran za regulaciju translacije *ELAVL4* mRNA što doprinosi regulaciji razvoja piramidnih neurona.

Rezultati ovog diplomskog rada su potvrdili rezultate dobivene u nedavnoj znanstvenoj studiji Popovitchenko i sur. 2020, u kojem se *in situ* hibridizacija i imunofluorescencija provodila na prenatalnim uzorcima mozga čovjeka. Međutim, u navedenoj studiji su analizirane isključivo proliferativne zone (VZ i SVZ), dok smo mi analizirali cijelu moždanu koru. Dakle, iako je bilo poznato da su RBP iz porodice Hu (HuD) uključeni u razvoj mozga prije rođenja, obrazac ekspresije tih proteina u prenatalnoj moždanoj kori čovjeka do sada nije opisan.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata proučavanjem ekspresijskog obrasca *ELAVL4* u prenatalnoj moždanoj kori može se zaključiti sljedeće:

- *In situ* hibridizacijom pokazali smo obrazac ekspresije *ELAVL4* mRNA u privremenim fetalnim zonama mozga tijekom ranog (10.-12. TNZ) i srednje fetalnog razvoja (13.-21. TNZ). *ELAVL4* mRNA se pokazala eksprimiranom u svim zonama, a posebice intenzivno između 13. i 17. TNZ.
- Metodom imunofluorescencije smo pokazali dinamičan obrazac ekspresije proteina HuD (*ELAVL4*) od 10. do 21. TNZ u privremenim fetalnim zonama mozga čovjeka.
- Protein HuD je tijekom ranog fetalnog razdoblja najintenzivnije eksprimiran u sljedećim privremenim fetalnim zonama: SVZ i KP, dok njegova reaktivnost nije detektirana u VZ.
- Tijekom srednje fetalnog razdoblja najintenzivniji signal HuD proteina je detektiran u VZ (od 17. TNZ) i MZ zoni, pri čemu je detektirana i ekspresija u SVZ i KP.
- Rezultati su pokazali da iako je eksprimirana *ELAVL4* mRNA, nije nužno eksprimiran i protein HuD, što sugerira prisutnost represora translacije *ELAVL4* mRNA.
- Rezultati diplomskog rada su u skladu s rezultatima nedavno objavljene studije (Popovitchenko i sur. 2020), u kojima se HuD (*ELAVL4*) pokazao kao molekularni marker ventralne radijalne glijne tijekom srednjeg fetalnog razdoblja.

## 6. LITERATURA

Akamatsu, W., Fujihara, H., Mitsuhashi, T., Yano, M., Shibata, S., Hayakawa, Y., Okano, H. J., Sakakibara, S., Hiroshi, T., Toshiya, T., Takahashi, T., Noda, T., Okano, H. (2005) The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 4625-4630. doi: 10.1073/pnas.0407523102

Anderson, K. D., Merhege, M. A., Morin, M., Bolognani, F., Perrone-Bizzozero, N. I. (2003) Increased expression and localization of the RNA-binding protein HuD and GAP-43 mRNA to cytoplasmic granules in DRG neurons during nerve regeneration. *Exp. Neurol.* **183**, 100-108. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00103-1

Anonymous (2016) Basicmedical Key - Fastest Basicmedical Insight Engine. Higher functions of the Nervous System <<https://basicmedicalkey.com/higher-functions-of-the-nervous-system/>>. Pristupljeno 1. lipnja 2020.

Anonymous (2018) Study Blue. Body planes and sections, <<https://www.studyblue.com/#flashcard/view/1153634>>. Pristupljeno 15. lipnja 2020.

Beckel-Mitchener, A. C., Miera, A., Keller, R., Perrone-Bizzozero, N. I. (2002) Poly(A) Tail Length-dependent Stabilization of GAP-43 mRNA by the RNA-binding Protein HuD. *The journal of Biological Chemistry* **277**, 27996–28002. doi: 10.1074/jbc.M201982200

Bolognani, F., Merhege, M. A., Twiss, J., Perrone-Bizzozero, N. I. (2004) Dendritic localization of the RNA-binding protein HuD in hippocampal neurons: association with polysomes and upregulation during contextual learning. *Neuroscience Letters* **371**, 152-157. doi: 10.1016/j.neulet.2004.08.074

Bronicki, L. M., Jasmin, B. J. (2013) Emerging complexity of the HuD/ELAV14 gene; implications for neuronal development, function, and dysfunction. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **19**, 10191037.

Bryant, C. D., Yazdani, N. (2016) RNA-binding proteins, neural development and the addictions. *Genes, Brain and Behavior* **15**, 169–186. doi:10.1111/gbb.12273

Bystron, I., Blakemore, C., Rakić, P. (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 110-122. doi: 10.1038/nrn2252



Chai, X., Frotscher, M. (2016) How does Reelin signaling regulate the neuronal cytoskeleton during migration? *Neurogenesis*. **3**, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1080/23262133.2016.1242455>

De Boer, E. M., Azevedo, R., Vega, T. A., Brodtkin, J., Akamatsu, W., Okano, H., Wagner, G. C., Rasin, M. R. (2014) Prenatal Deletion of the RNA-Binding Protein HuD Disrupts Postnatal Cortical Maturation and Behavior. *The Journal of Neuroscience* **34**, 3674-3686. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3703-13.2014

Deschenes-Furry, J., Perrone-Bizzozero, N., I., Jasmin, B. J. (2006) The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity. *Bioessays* **28**, 822-833. doi: 10.1002/bies.20449

Di Liegro, C., Schiera, G., Di Liegro, I. (2014) Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals. *International Journal of Molecular Medicine* **33**, 747-762. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1629>

Eisel, D., Seth, O., Grünewald-Janho, S., Kruchen, B. (2008) DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization, 4. izd., Roche Diagnostics GmbH, <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General\\_Information/1/digapplication-manual-for-nonradioactive-in-situ-hybridisation-iris.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/digapplication-manual-for-nonradioactive-in-situ-hybridisation-iris.pdf)>. Pristupljeno 15. svibnja 2020.

Fatterpekar, G.M., Naidich, T.P., Delman, B.N., Aguinaldo, J.G., Gultekin, S.H., Sherwood, C.C., Hof, P. R., Drayer, B. P., Fayad, Z. A. (2002): Cytoarchitecture of the human cerebral cortex: MR microscopy of excised specimens at 9.4 Tesla. *Am. J. Neuroradiol.* **23**, 1313–1321.

Gallo, J., Spickett, C. (2010) The role of CELF proteins in neurological disorders. *RNA Biology* **7**, 474-479. <https://doi.org/10.4161/rna.7.4.12345>

Guo, J., Transcription: the epicenter of gene expression (2014) *Journal of Zhejiang University* **15**, 409-411. doi:10.1631/jzus.B1400113

Hrabač, P., Bosak, A., Vukšić, M., Kostović, I., Krsnik, Ž. (2018) The Zagreb Collection of human brains: entering the virtual world. *Croat. Med. J.* **59**, 283–287. doi: 10.3325/10.3325/cmj.2018.59.283

Im, K., Mareninov, S., Palma, D., Fernando, M., Yong, W. H. (2019) An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol. Biol.* **1897**, 299–311. doi:10.1007/978-14939-8935-5\_26

- Jessen, K. R. (2004) Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1861–1867. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.023
- Judaš, M., Kostović, I. (1997) *Temelji neuroznanosti, Medicinska dokumentacija, Zagreb*.  
<<http://www.hiim.unizg.hr/index.php/udzbenik-temelji-neuroznanosti>>. Pristupljeno 1. travnja 2020.
- Keene, J. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 533-543. doi: 10.1038/nrg2111
- Kong Tong, C., Vidyadaran, S. (2016) Role of microglia in embryonic neurogenesis. *Experimental Biology and Medicine* **241**, 1669–1675. doi: 10.1177/1535370216664430
- Kostović, I., Judaš, M. (2015) Embryonic and Fetal Development of the Human Cerebral Cortex. U: *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference (Toga, W., A.) Vol. 2: Anatomy and Physiology, Systems, Elsevier*, str. 167–175. doi: 10.1016/B978-0-12-397025-1.00193-7
- Kostović, I., Sedmak, G., Vukšić, M., Judaš, M. (2015) The Relevance of Human Fetal Subplate Zone for Developmental Neuropathology of Neuronal Migration Disorders and Cortical Dysplasia. *CNS Neurosci. Ther.* **21**, 74-82. doi: 10.1111/cns.12333
- Kristiansen, M., Ham, J. (2014) Programmed cell death during neuronal development. *Cell Death and Differentiation* **21**, 1025-1035. doi: 10.1038/cdd.2014.47
- Lennox, L. A., Mao, H., Debra, L. S. (2018) RNA on the brain: emerging layers of posttranscriptional regulation in cerebral cortex development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **7**, 1-27. doi:10.1002/wdev.290
- Molnar, Z., Clowry, G. J., Šestan, N., Alzu'b, A., Bakken, T., Hevner, R. F., Huppi P. S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E. S., Edwards, D., Garcez, P., Hoerder-Suabedissen, A., Kriegstein, A. (2019) New insights into the development of the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy* **235**, 432-451. <https://doi.org/10.1111/joa.13055>
- Perrone-Bizzozero, N., Bird, W. C. (2013) Role of HuD in nervous system function and pathology. *Frontiers in Bioscience* **5**, 554-563. doi: 10.2741/s389
- Pilaz, L., Silver, D. L. (2015) Post-transcriptional regulation in corticogenesis: how RNA binding proteins help build the brain. *Wiley Interdiscip Rev. RNA* **6**, 501-515. doi:10.1002/wrna.1289
- Popovitchenko, T., Park, Y., Page, N. F., Luo, X., Krsnik, Ž., Liu, J., Salamon, I., Stephenson, J.

D., Kraushar, M. L., Volk, N. L., Patel, S. M., Wijeratne, H. R. S., Li, D., Suthar, Kandarp, S. S., Wach, A., Sun, M., Arnold, S. J., Akamatsu, W., Okano, H., Paillard, L., Zhang, H., Buyske, S., Kostović, I., Rubeis, S., Hart, R. P., Rasin, M. R. (2020) Translational derepression of Elavl4 isoforms at their alternative 5' UTRs determines neuronal development. *Nature Communications* **11**, 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15412-8>

Popovitchenko, T., Rasin, M. R. (2017) Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanisms of the Development of Neocortical Lamination. *Frontiers in Neuroanatomy* **11**, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00102>

Rakić, P. (1988) Specification of Cerebral Cortical Areas. *Science* **241**, 170-176. doi: 10.1126/science.3291116

Rio, C. D. (1992) RNA binding proteins, splice site selection, and alternative pre-mRNA splicing. *Gene expression* **2**, 1-5.

Rubenstein, J. L.R. (2011) Development of the Cerebral Cortex: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *J. Child Psychol. Psychiatry* **52**, 339–355. doi:10.1111/j.14697610.2010.02307.x

Srikantan, S., Gorospe, M. (2015) HuR function in disease. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* **17**, 189–205. doi: 10.2741/3921

Van Driesche, S.J., KC, M. (2018) New frontiers in RNA transport and local translation in neurons. *Dev. Neurobiol.* **78**, 331–339. doi: 10.1002/dneu.22574

Zhou, H., Mangelsdorf, M., Liu, J., Zhu, L., Wu, J. Y. (2014) RNA-binding proteins in neurological diseases. *Science China Life Science* **57**, 432-444. doi: 10.1007/s11427-014-4647-9

Zilles, K., Amunts K. (2010) Centenary of Brodmann's map — conception and fate. *Nature reviews Neuroscience* **11**, 139-145. doi: 10.1038/nrn2776

Zivraj, K. H., Tung, Y. C. L., Piper, M. P., Gumy, L., Fawcett, J. W., Yeo, G. S. H., Holt, C. E. (2010) Subcellular Profiling Reveals Distinct and Developmentally Regulated Repertoire of Growth Cone mRNAs. *The Journal of Neuroscience* **30**, 15464 –15478. doi: 10.1523/JNEUROSCI.180010.2010

## 7. PRILOZI

AS - *alternative splicing*, hrv. alternativno procesiranje

BA - *Brodmann area*, hrv. Brodmanovo područje

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

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*, hrv. 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA - *deoxyribonucleic acid*, hrv. deoksiribonukleinska kiselina

ECM - *ekstracelularni matriks*

ELAVL4 - *Embryonic Lethal Abnormal Vision phenotype*

GABA - *gama-aminomaslačna kiselina*

SS-DNA- *salmon sperme DNA*, hrv. DNA sperme lososa

IF - *imunofluorescencija*

ISH - *in situ hibridizacija*

IZ - *intermedijalna zona*

KP - *kortikalna ploča*

MABT - *maleic acid buffer containing Tween 20*, hrv. pufer maleinske kiseline koji sadrži Tween 20

mRNA - *messenger (glasnička) ribonukleinska kiselina*

RBP - *RNA binding proteins*, hrv. RNA vezujući proteini

RNA - *ribonucleic acid*, hrv. ribonukleinska kiselina

RRM - *RNA recognition motifs*, hrv. RNA prepoznavajući motivi

MZ - *marginalna zona*

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

PP - *preplate zona*

PŽS - *periferni živčani sustav*

SP - *subplate zona*

SSC - *saline-sodium citrate*, hrv. otopina soli natrij-citrata

SVZ - *subventrikularna zona*

SŽS - *središnji živčani sustav*

TNZ - *tjedan nakon začeca*

TRIS - *trishydroximetilaminmetane*, hrv. trishidroksimetilaminometan

UTR - *untranslated region*, hrv. netranslatirajuća regija

VZ - *ventrikularna zona*

## **Izjava o izvornosti**

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

---

Ime i prezime studenta