

# Izražaj Semaforina5A u mozgu miša tijekom ranog postnatalnog razvoja

---

**Putar, Darija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:980615>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Darija Putar

Izražaj Semaforina5A u mozgu miša tijekom ranog  
postnatalnog razvoja

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za imunohistokemiju na Odsjeku za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nataše Jovanov-Milošević i suvodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

## Zahvala

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataši Jovanov-Milošević na stručnom vodstvu, strpljivosti, podršci, svim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada, na ukazanom povjerenju, poticanju samostalnog rada i kritičkog razmišljanja, što mi je omogućila rad u Laboratoriju za imunohistokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i otvorila vrata neuroznanosti.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Dubravki Hranilović na svemu što me naučila, zainteresirala za neuroznanost, na pruženoj stručnoj pomoći i svim savjetima.*

*Posebno zahvaljujem Sari Trnski na nesebičnoj pomoći, strpljivosti i velikoj podršci prilikom izrade diplomskog rada.*

*Hvala i gospođama Božici i Maji na strpljenju, razumijevanju i pomoći u laboratoriju.*

*Također, zahvaljujem svojoj obitelji i Vladimiru Brajkoviću što su vjerovali u mene i pružali mi podršku tijekom studija.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## IZRAŽAJ SEMAFORINA5A U MOZGU MIŠA TIJEKOM RANOG POSTNATALNOG RAZVOJA

Darija Putar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Semaforin5A (Sema5A) je transmembranski protein koji ima ulogu bifunkcionalne navodilačke molekule aksona tijekom elongacije aksona za vrijeme razvoja mozga. Pretpostavlja se da ima ulogu i u proliferaciji i migraciji neuronskih prekursorskih stanica. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su transkripti gena *Sema5A* najistaknutiji u proliferativnim zonama telencefaličkog mjehurića tijekom embrionalnog razvoja mozga glodavaca, ali izražaj proteina Sema5A tijekom razvoja telencefalona nije dosada pokazan. Cilj ovog diplomskog rada bio je otkriti izražaj proteina Sema5A uporabom indirektna imunohistokemijske metode tijekom ranog postnatalnog razvoja u mozgu miša 5. i 15. postnatalnog (P) dana te prikazati njegovu prostornu raspodjelu u ove dvije vremenske točke značajne za razvoj moždane kore, u svrhu boljeg razumijevanja njegove razvojne uloge. Pokazali smo razlike u izražaju Sema5A, kako u vremenu, tako i u regijama moždane kore miša. Otkriven je izražaj proteina Sema5A u II./III. sloju motoričkog korteksa tijekom sazrijevanja te konstantan izražaj i perisomatsko obojenje stanica u II./III. sloju insularnog i drugom sloju piriformnog korteksa. Najistaknutija promjena izražaja vidljiva je u somatosenzoričkom korteksu, gdje izražaj vidljiv u V. i VI.b sloju dana P5, prelazi u snažniji izražaj u II./III. sloju i slabiji izražaj u V. sloju korteksa dana P15. Rezultati sugeriraju da protein Sema5A sudjeluje u postmigracijskom sazrijevanju neurona, najvjerojatnije u inicijalnom formiranju neuronskih nastavaka.

(39 stranica, 14 slika, 2 tablice, 40 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: telencefalon, korteks, izrastanje i elongacija neurita

Voditelj: prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević

Suvoditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

prof. dr. sc. Zlatko Liber

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 06.09.2018.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

## THE EXPRESSION OF SEMAPHORIN5A IN THE EARLY- POSTNATAL MOUSE BRAIN

Darija Putar

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Semaphorin5A (Sema5A) is a transmembrane protein, that has a role of bifunctional axon guidance molecule for axon elongation during brain development. According to previous studies transcripts of *Sema5A* gene are most prominent in proliferative zones of telencephalic vesicle during embryonic brain development in rodents, but the expression of Sema5A protein during development of telencephalon has not been shown. We aimed to reveal the expression of Sema5A protein by using an indirect immunohistochemical method during early postnatal development in the mouse brain at postnatal (P) 5. and P15. day, to show spatial distribution in these two developmental time points important for the development of brain cortex and to better understand its developmental role. The expression of Sema5A protein showed differences in temporal and regional distribution in the mouse brain cortex. We revealed the expression of Sema5A protein in the II./III. layer of motor cortex during maturation and constant expression with perisomatic staining of the cells in the II./III. layer of insular cortex and the second layer of piriform cortex. The most prominent change in expression was in somatosensory cortex where expression changes from V. and VI.b layer (P5) to II./III. and V. layer (P15). The results suggest that Sema5A protein is involved in postmigration neuronal maturation, most likely in the initial formation of neurites.

(39 pages, 14 figures, 2 tables, 40 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: telencephalon, cortex, neurite growth and elongation

Supervisor: Prof. Nataša Jovanov Milošević, PhD

Co-supervisor: Prof. Dubravka Hranilović, PhD

Reviewers: Prof. Dubravka Hranilović, PhD; Prof. Zlatko Liber, PhD;

Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Thesis accepted: 06.09.2018.

# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Razvoj telencefalona.....	1
1.2.	Embrionalni razvoj korteksa miša .....	2
1.3.	Razvoj neokortikalnih aksona .....	3
1.4.	Obitelj semaforina .....	5
1.4.1.	Semaforinski receptori .....	7
1.5.	Semaforin5A.....	9
1.6.	Izražaj mRNA <i>Sema5A</i> u neokorteksu glodavaca tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja .....	10
1.7.	Bifunkcionalna priroda <i>Sema5A</i> .....	13
1.8.	Uloga <i>Sema5A</i> u razvoju vidnog živca i retine .....	14
1.9.	Uloga <i>SEMA5A</i> u nastanku bolesti .....	14
2.	CILJ RADA .....	16
3.	MATERIJALI I METODE .....	17
3.1.	Materijali .....	17
3.1.1.	Životinje .....	17
3.1.2.	Kemikalije .....	17
3.1.3.	Pribor i pomagala .....	18
3.2.	Metode .....	19
3.2.1.	Fiksacija tkiva transkardijalnom perfuzijom.....	19
3.2.2.	Izrada histoloških preparata .....	20
3.2.3.	Indirektna imunohistokemija – avidin-biotin kompleks (ABC) metoda....	20
3.2.4.	Bojanje po Nisslu .....	21
3.2.5.	Analiza i fotografiranje preparata .....	21
4.	REZULTATI.....	23

4.1.	Izražaj semaforina5A u korteksu miša .....	23
4.2.	Izražaj Sema5A proteina u mozgu miša petog postnatalnog dana .....	23
4.3.	Izražaj Sema5A proteina u mozgu miša petnaestog postnatalnog dana .....	24
5.	RASPRAVA .....	32
6.	ZAKLJUČAK .....	34
7.	LITERATURA .....	35
8.	ŽIVOTOPIS .....	39



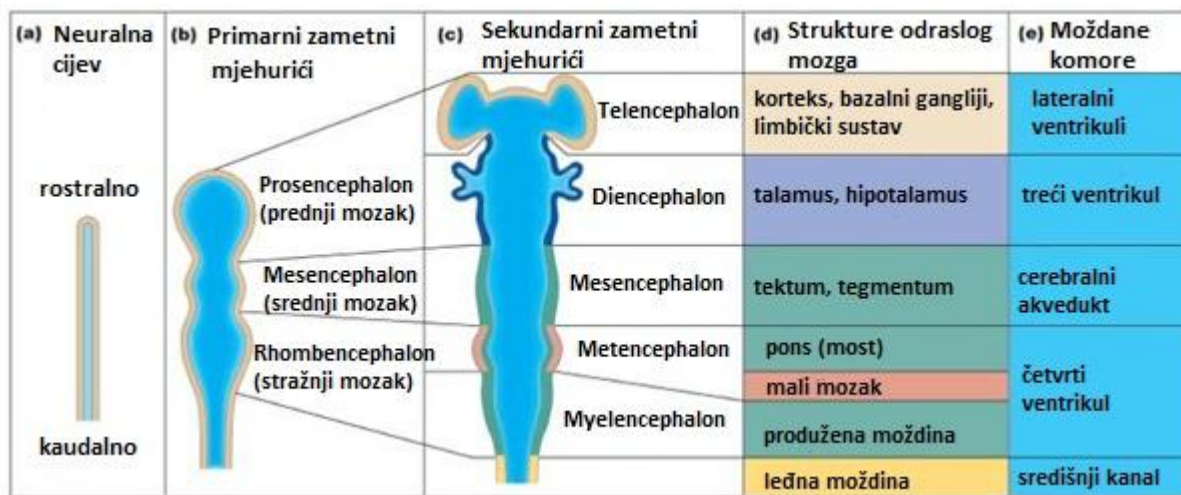
## POPIS KRATICA:

ABC metoda	avidin – biotin kompleks metoda
BSA	goveđi serumski albumin
BrdU	bromodeoksiuridin
CDCS	Cri-du chat sindrom
CP	kortikalna ploča
CSPG	hondroitin – sulfat proteoglikani
CTNND2	katenin delta 2
DAB	3,3' - diaminobenzidin
E	embrionalni dan
ECM	ekstracelularni matriks
GPI	glikozilfosfatidilinositol
GWAS	genome – wide association study
HSPG	heparan – sulfat proteoglikani
IZ	intermedijalna zona
MZ	marginalna zona
Npn	neuropilin
P	postnatalni dan
PBS	fosfatni pufer
PFA	paraformaldehid
PP	preplate sloj
PRN	periretikularna jezgra
RGC	retinalne ganglijske stanice
Sema5A	semaforin5A
SNP	single nucleotide polymorphism
SP	subplate zona
SVZ	subventrikularna zona
VZ	ventrikularna zona
WM	bijela tvar

# 1. UVOD

## 1.1. Razvoj telencefalona

Središnji živčani sustav se sastoji od velikog mozga podijeljenog na krajnji mozak (*telencephalon*) i međumozak (*diencephalon*); malog mozga (*cerebellum*) i moždanog debla (*truncus encephalicus*) građenog od srednjeg mozga (*mesencephalon*), mosta (*pons*) i produljene moždine (*medulla oblongata*). Razvoj živčanog sustava kreće od stvaranja neuralne ploče, preko neuralnog utora do neuralne cijevi. Od prednjeg, rostralnog dijela neuralne cijevi razvija se prosencefalon, primarni zametni mjehurić. Iz prosencefalona i parnih telencefaličkih mjehurića razvije se telencefalon tj. razvijaju se moždane polutke čiju površinu čini moždana kora, a unutrašnjost čini bijela tvar, bazalni gangliji i lateralne moždane komore (Slika 1.). Od središnjeg dijela, između telencefaličkih mjehurića, razvijaju se strukture mediobazalnog telencefalona, *lamina terminalis* i komisurni sustavi: *corpus callosum*, *commisura anterior* i *commisura hippocampi* (za pregled vidi udžbenik Judaš i Kostović, 1997).



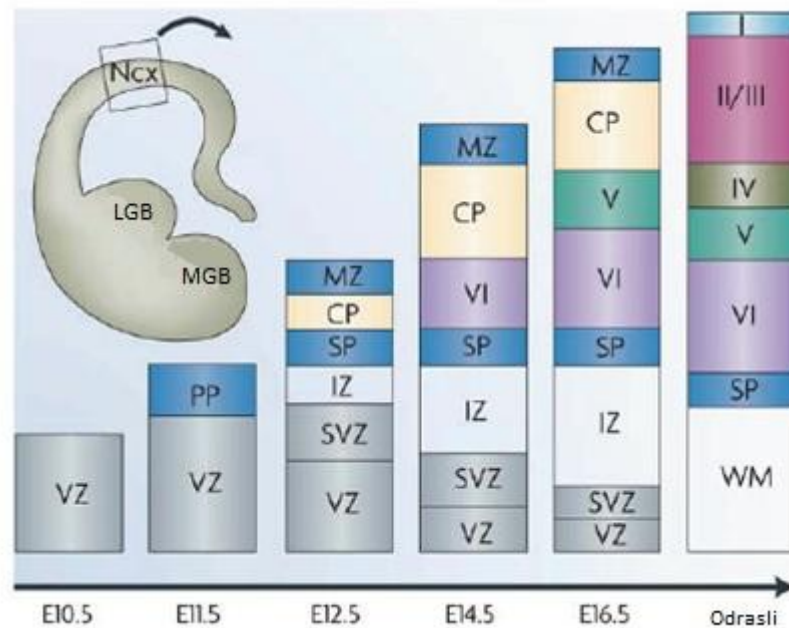
**Slika 1.** Razvoj neuralne cijevi u primarne i sekundarne zametne mjehuriće te glavne strukture odraslog mozga. (prilagođeno prema <http://rosswikijan2008.pbworks.com/w/page/14975568/Development%20of%20Nervous%20System>)

## 1.2. Embrionalni razvoj korteksa miša

Tijekom razvoja embrionalnog i fetalnog mozga dolazi do stvaranja prolaznih razvojnih embrionalnih i fetalnih zona. One prostorno i vremenski određuju histogenetske procese (Judaš i Kostović, 1997.). Stvaranje slojeva tj. zona i distribucija različitih vrsta stanica i vlakana uzrokuje karakterističnu laminarnu organizaciju kore krajnjeg mozga. Prateći princip „iznutra prema van“ prvo se stvaraju neuroni dubljih slojeva, a kasnije proliferiraju neuroni površinskih slojeva (Rakić, 1988.). Prvo se razvija ventrikularna zona (VZ), smještena uz šupljinu neuralne cijevi, a kasnije uz šupljinu fetalnih moždanih komora (ventrikula). Pravilna migracija neurona je ključna za pravilan razvoj i organizaciju krajnjeg mozga. Reelin, glikoprotein kojeg izlučuju Cajal-Retziusove stanice marginalne zone (MZ) u izvanstanični matriks omogućuje oblikovanje dugih nastavaka radijalne glije koje služe kao vodilja migrirajućim neuronima od ventrikularne zone do pijaline površine (Tissir i Goffinet, 2003.)

Desetog embrionalnog dana (E10) razvoja miša stvara se telencefalički mjehurić građen od neuroepitela i podijeljen na ventrikularnu zonu u kojoj se odvija proliferacija stanica i zonu s nastavcima tih stanica uz vanjsku graničnu membranu (Angevine i Sidman, 1961.). Preteče neurona i makroglija u mozgu su neuroepitelne stanice nastale u ventrikularnoj, a kasnije i u subventrikularnoj zoni (SVZ) (Judaš i Kostović, 1997.). Stratifikacija neokorteksa počinje tijekom jedanaestog embrionalnog (E11) dana kada se između VZ i zone uz vanjsku membranu stvara intermedijalna zona (IZ) koju čine nediferencirani migrirajući neuroni i rastući aksoni (Smart, 1984.). Prvi postmitotički neuroni stvoreni u VZ migriraju sve do pijaline površine i dvanaestog embrionalnog dana (E12) stvaraju marginalnu zonu (MZ) ili primordijalni pleksiformni tj. *preplate* sloj (PP), kojeg čine polimorfni neuroni s nezrelim aksonima i dendritima (Goffinet, 1979.). Tijekom trinaestog embrionalnog dana (E13) javlja se *subplate* zona (SP) (Del Río i sur., 2000.) i kortikalna ploča (CP). Četrnaestog embrionalnog dana (E14) telencefalička stijena se sastoji od MZ, CP, SP, IZ i VZ. Postmigratorni neuroni MZ i SP su najviše diferencirani u toj dobi, horizontalno položeni i bitni za razvoj kortikalnih veza (Del Río i sur., 2000.). Šesnaestog embrionalnog dana između VZ i IZ stvara se subventrikularna zona s mnogo postmitotičkih neurona (Smart, 1984.). Od pijaline površine mozga prema lateralnim ventrikulima neokorteksa miša tada slijede zone: MZ, CP, SP, IZ, SVZ, VZ kako prikazuje Slika 2. (Molyneaux i sur., 2007.). Ventrikularna zona, intermedijalna zona i marginalna zona su univerzalne embrionalne zone neuralne cijevi, dok su subventrikularna zona, subplate i kortikalna ploča karakteristične za fetalni

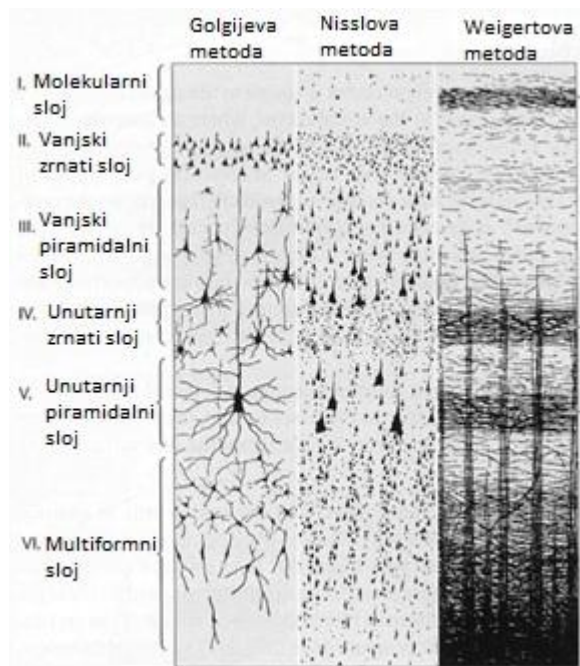
telencefalon. Osnovu razvoja moždane kore čine MZ, CP i SP (Judaš i Kostović, 1997.). MZ je budući I. sloj moždane kore koja je bogata neuritima i Cajal-Retzuisonim neuronima (prve stvorene stanice), a CP se dijeli u buduće slojeve II - VIb moždane kore i postiže svoju maksimalnu debljinu dana E18. Sadrži slabo diferencirane i radijalno posložene neurone (Molyneaux i sur., 2007.). Postnatalnog nultog (P0) dana neuroepitel je značajno reduciran i čini mali dio moždane kore (Skaliora i sur., 1998.).



**Slika 2.** Stvaranje embrionalnih zona tijekom razvoja u neokorteksu miša. Ncx – neokorteks, LGB – lateralni ganglijski brežuljak, MGB – medijalni ganglijski brežuljak. (prilagođeno prema Molyneaux i sur., 2007.)

### 1.3. Razvoj neokortikalnih aksona

Razvijeni korteks se sastoji od šest tangencijalnih slojeva I-VI (Slika 3.). Ti se slojevi razlikuju po obliku i broju stanica te debljini mijeliniziranih aksona. Uz laminarnu organizaciju, neokorteks je organiziran u okomite stupiće (*columnae*). Oni se protežu kroz sve slojeve korteksa i temeljne su strukturno-funkcionalne jedinice za obradu informacija. Takve kortikalne kolumne međusobno povezuju snopovi aksona: asocijativna vlakna povezuju kolumne iste hemisfere, dok komisuralna vlakna povezuju kolumne suprotnih hemisfera kroz *corpus callosum*, a projekcijska vlakna (eferentna i aferentna) povezuju korteks sa subkortikalnim središtima.



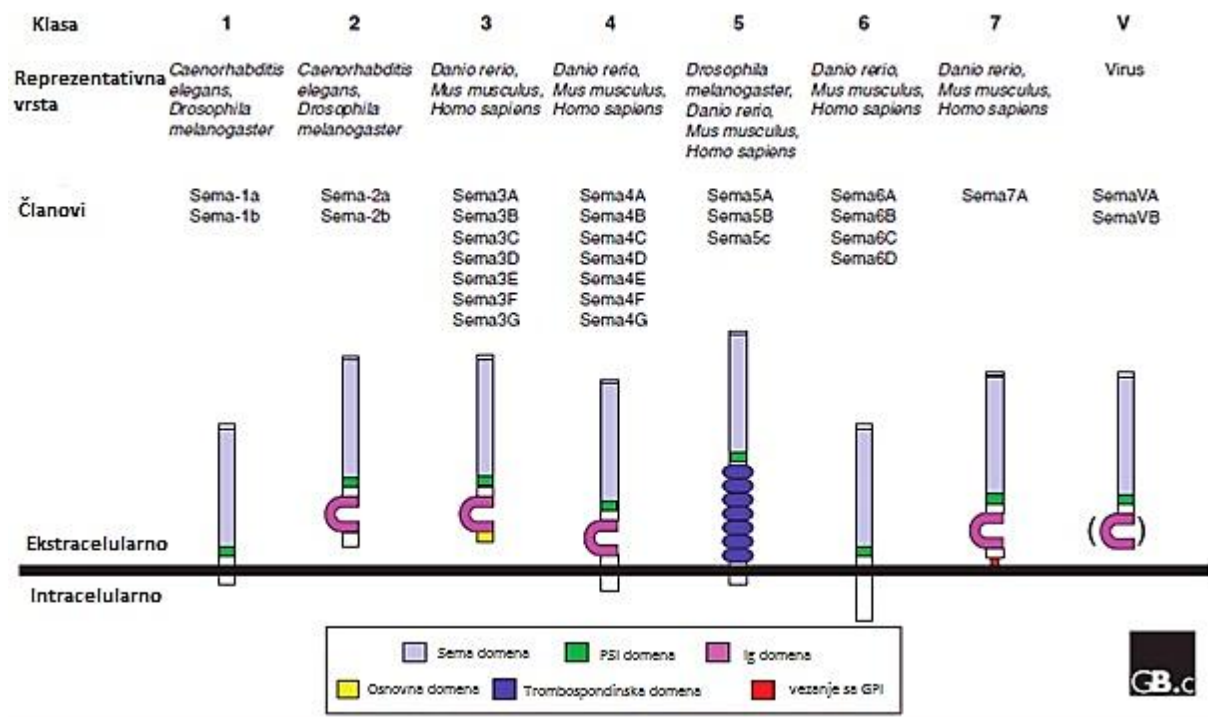
**Slika 3.** Slojevi korteksa. (prilagođeno prema <http://www.learnneurosurgery.com/cerebral-cortex---layers.html>)

Razvoj aksona odvija se istovremeno s radijalnom i tangencijalnom migracijom stanica za vrijeme razvoja telencefalona. Klase aksona u IZ su: talamokortikalna, kortikotalamička, ipsilateralna i kontralateralna kortikokortikalna, i monoaminergična (Crandall i Caviness, 1984.). Prema Auladell i sur. (2000.) kortikotalamički aksoni kod miša dana E13 prolaze kroz IZ i preko *corpus striatum* do dana E15 stižu u talamus. Talamokortikalni aksoni kroz *capsulu internu* dana E13 ulaze u IZ i dana E14 prolaze kroz SP. Petnaestog embrionalnog dana počinju radijalno rasti u korteks, ulazeći u svaki sloj kako se kortikalni slojevi diferenciraju. Do dana P0 talamokortikalna vlakna formiraju razgranati sustav unutar V. i VI. sloja. Prema Del Río i sur. (2000.) aksoni SP neurona prvi rastu iz neokorteksa prema ganglijskom brežuljku dana E13. U *striate primordiumu* dana E14 susreću aksone talamusa i nastavljaju rasti do talamusa tijekom prenatalnog razvoja. Talamokortikalni aksoni dana E16 ulaze u gornje slojeve korteksa. Prema Skalióra i sur. (1998.) prvi talamokortikalni aksoni kod štakora dana E14 napuštaju diencefalon i prolaze uz ganglijski brežuljak do bazalnog telencefalona. Istovremeno kortikotalamički aksoni rastu od korteksa prema talamusu. Obje klase aksona izbjegavaju proliferativni neuroepitel VZ.

## 1.4. Obitelj semaforina

Tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja rast aksona moduliraju neurotrofički faktori i njihovi receptori, mnoge molekule ekstracelularnog matriksa (fibronektin, sulfatni proteoglikani...) i druge molekule vodiči poput netrina, ephrina i semaforina zajedno sa svojim receptorima (Jovanov, 2001., Judaš i sur., 2003.). Na pozitivne i negativne kemotaksijske signale iz mikrookoliša odgovara rastući čunjić, dinamička struktura na vrhovima rastućih izdanaka svakog neurona, pomoću receptora na staničnoj površini. Neuronima omogućuje precizno grananje i povezivanje tijekom razvoja živčanog sustava (Purohit i sur., 2014.).

Semaforini su velika obitelj filogenetski konzerviranih proteina, poznati kao navodilačke molekule ili molekule vodiči koje sa svojim receptorima reguliraju rast aksona i dendrita tijekom razvoja živčanog sustava (Purohit i sur., 2014.). Izlučeni, usidreni i transmembranski semaforini u ulozi repelenata i atraktanata neurita (Jovanov, 2001.) utječu na usmjeravanje aksona, fascikulaciju, grananje i formiranje sinapsi (Alto i Terman, 2017., Judaš i sur. 2003). Također sudjeluju u kardiovaskularnom razvoju, angiogenezi, formiranju tumora i metastaza i imunomodulaciji (Alto i Terman, 2017.) Semaforini sudjeluju i u prirodnoj smrti prekobrojnih aksona u hipokampusu, ali imaju i funkcionalnu ulogu u laminaciji i projekciji hipokampalnih traktova (Chivatakarn, 2008.). Riječ semaforin dolazi od grčke riječi „*semapfore*“, označava prijenos informacije signalizacijom i koristi se za sve proteine i gene koji su članovi obitelji semaforina. Svi semaforini sadrže izvanstaničnu semaforin (sema) domenu od približno 500 aminokiselina na N-kraju s višestruko očuvanim cisteinskim ostacima i za klasu specifičan C-kraj koji može sadržavati dodatne sekvence aminokiselina. U odnosu na staničnu membranu mogu biti izlučeni, transmembranski i usidreni na glikozilfosfatidilinositol (eng. *glycosylphosphatidylinositol*, GPI) (Slika 4.).



**Slika 4.** Građa pojedinih klasa semaforina s predstavnicima vrsta i članovima semaforina koje te vrste imaju (prilagođeno prema Yazdani i Terman, 2006.).

Gledajući nomenklaturu semaforina, skraćeno ih nazivamo SEMAnX (za kralježnjake i čovjeka), SemaX (za glodavce) i Sema-nx (za beskralježnjake), gdje je n broj klase, a X slovo obilježenog člana iz obitelji semaforina (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999.). Trenutno obitelj semaforina ima 20 članova kod miša i čovjeka te 5 članova kod *Drosophile*. Dijele se u 8 klasa, 1-7 i V. Beskralježnjaci imaju semaforine klase 1 i 2, kralježnjaci imaju semaforine klase 3-7, a semaforini klase V nađeni su samo kod virusa (Yazdani i Terman, 2006.).

Najbolje proučeni semaforini i jedni od prvih otkrivenih su semaforini klase 3 i semaforin3A, za kojeg je prvog otkriveno da uzrokuje kolaps rastućeg čunjića neurona, da je nužan za pravilan razvoj perifernog živčanog sustava i pravilnu fascikulaciju kranijalnih i leđno-moždinskih živaca (Luo i sur., 1993.). Semaforin3F važan je za pravilnu fascikulaciju olfaktorno-hipokampalnog i limbičkog sustava (Sahay i sur., 2003.), a semaforin3B za fascikulaciju anteriorne komisure (Falk i sur.,2005).

Smatra se da semaforini tijekom razvoja središnjeg živčanog sustava:

- a) sprječavaju elongaciju neurita u ventrikularni neuroepitel,
- b) embrionalnoj kortikalnoj ploči dodjeljuju privremenu neprijemčivost kako bi regulirali radijalnu invaziju kortikopetalnih aferenata,
- c) ograničavaju ekstenziju aksona na intermedijalnu i *subplate* zonu,
- d) održavaju fascikulaciju talamokortikalnih i kortikotalamičkih aksona i sprječavaju njihovu kolateralizaciju (grananje) dok rastu kroz *striatum*,
- e) ograničavaju terminalne arborizacije talamičkih aferenata do sloja IV

te da sudjeluju u:

- f) u proliferaciji i migraciji neurona,
- g) promoviranju rasta pojedinih subpopulacija aksona (Skaliora i sur., 1998.).

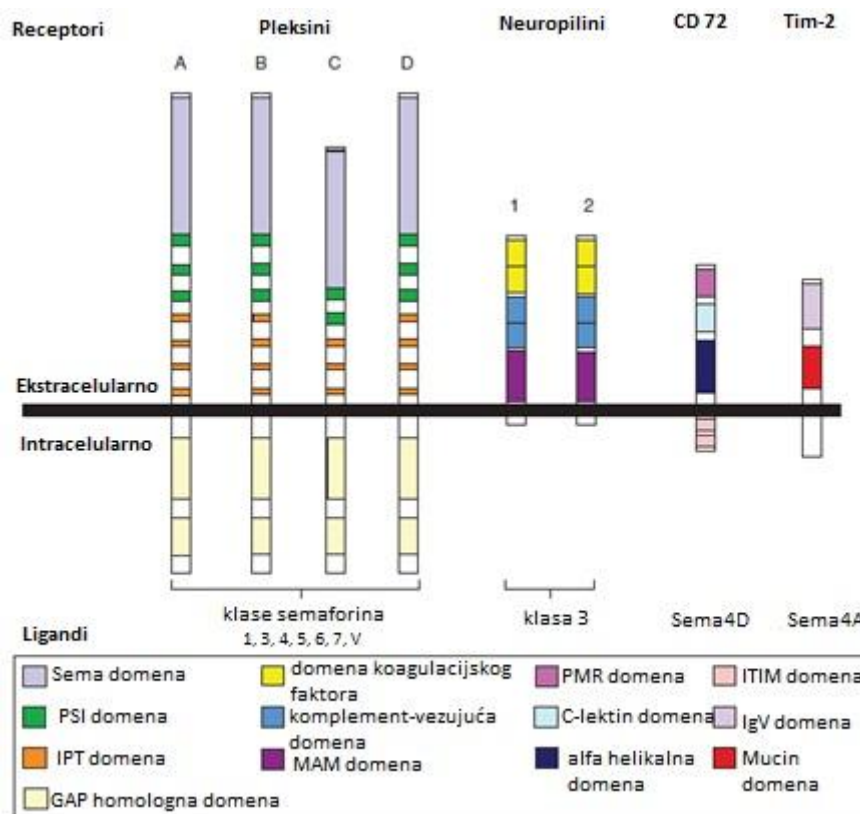
### **1.4.1. Semaforinski receptori**

Semaforini vrše svoje funkcije kao ligandi, vezujući se svojim ekstracelularnim domenama na druge proteine. Receptori na koje se vežu semaforini su pleksini i neuropilini (Slika 5.). Sve klase izuzev 2., direktno se vežu s pleksinima (Yazdani i Terman, 2006.). Pleksini mogu biti vezani na membranu i izlučeni, a vezani sa semaforinima posreduju autokrino i parakrino signaliziranje. Semaforin-pleksin signalizacija aktivira se interakcijom sema domena, koju pleksini kao i semaforini sadrže u svom ekstracelularnom dijelu. Sema domena može djelovati i auto-inhibitorno bez prisutstva liganda, sprječavajući aktivaciju samog receptora (Purohit i sur., 2014.). Kod kralježnjaka je pronađeno 9 pleksina koje dijelimo u 4 potporodice (pleksinA1-4, pleksinB1-3, pleksinC i pleksinD). To su membranski proteini tipa-1 koji sadržavaju sema domenu u svojoj ektodomenu i imaju veliku intracelularnu domenu. Dok ostale klase semaforina direktno vežu i aktiviraju pleksine, semaforini klase 3 osiguravaju svoju funkciju preko receptorskog kompleksa od Npn ligand-vezujuće podjedinice i pleksin podjedinice/komponente koja prenosi signal. Neuropilini se različito vežu na izlučene semaforine (Chivatakarn, 2008.) Prvi otkriveni semaforinski receptor koji sudjeluje u odbijajućem efektu izlučenih semaforina klase 3, bio je neuropilin-1 (Npn-1) koji se veže sa Sema3A. Neuropilini imaju veliku ektodomenu (2 komplement-vezujuće domene i 2 domene za koagulacijski faktor i MEM domena) i kratku intracelularnu domenu (Chivatakarn, 2008.). Otkirvena su dva neuropilina, Npn-1 i Npn-2, mogu biti



membranski i izlučeni. Zbog kratke intracelularne domene formiraju komplekse s pleksinima i VEGF receptorima kako bi odaslali signal (Purohit i sur., 2014.).

Kaskada transdukcije signala kod semaforina nije posve razjašnjena. Pokazalo se da mnogi proteini, uključujući G proteine, kinaze, oksidacijsko-redukcijski enzimi i regulatori aktinskog citoskeleta sudjeluju u signalnim putevima (Yazdani i Terman, 2006.). Intracelularne domene pleksina međudjeluju s različitim tirozin kinazama (Met, ERBB2 i Src) pošto same nemaju kinaznu aktivnost, što može utjecati na različito djelovanje. Transdukcija signala pokreće se ili autofosforilacijom tirozin-kinaza ili fosforilacijom tirozinskih ostataka u citoplazmatskoj domeni pleksina preko efektora poput Rho koji kontroliraju aktivaciju integrina i dinamiku citoskeleta (Purohit i sur., 2014.). Semaforini također mogu imati ulogu receptora za pleksine i posreduju u njihovim funkcijama „reverznom signalizacijom“. Transmembranski semaforini mogu funkcionirati kao receptori nužni za stvaranje pravilne neuronske povezanosti (Yazdani i Terman, 2006.).



**Slika 5.** Vrsta i grada semaforinskih receptora (prilagođeno prema Yazdani i Terman, 2006.).

## 1.5. Semaforin5A

Semaforini klase 5 razlikuju se od ostalih klasa po svojoj izvanstaničnoj domeni (ektodomeni) koja se sastoji od sema domene i skupine (klastera) od sedam trombospondinskih ponavljanja tipa 1. Sadrže i transmembransku regiju i kratku citoplazmatsku domenu. Kod kraljevnjaka (i čovjeka) su nađeni semaforin5A (SEMA5A) i semaforin5B (SEMA5B), a kod *Drosophila* je nađen semaforin5C (Sema-5c). Semaforin5A (prethodno zvan semF) prvi put je nađen u mišjem embriju dobi E12 dana, gdje je jaki izražaj mRNA otkriven u nediferenciranom neuroepitelu i oko rastućih somita, zajedno sa izražajem mRNA semaforina5B. Sema5A i Sema5B visoko su srodni (Adams i sur., 1996.). Trombospondinska ponavljanja promoviraju pričvršćivanje stanica na substrat ekstracelularnog matriksa (Purohit i sur., 2014.) i potiču rast neurita različitih neurona (Jovanov, 2001.).

Semaforin5A je transmembranski glikoprotein, primarno izražen u živčanom tkivu. Građen je od 1074 aminokiseline, sastoji se od sema domene, sedam trombospondinskih ponavljanja tipa 1 s C-terminalnom domenom, transmembranske domene i kratke citoplazmatske domene (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999.). Sema domena se sastoji od mjesta za N-glikozilaciju, 12 cisteinskih ostataka i nekoliko kratkih ponavljajućih sekvenci (Kolodkin i sur., 1993.). Kod čovjeka se gen *SEMA5A* nalazi na 5. kromosomu i ima 28 egzona, a kod miša na 15. kromosomu s 25 egzona; (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9037>).

Prema Jovanov, 2001. Sema5A djeluje na kortikalne eferente neokorteksa miša u *in vitro* uvjetima; potiče njihovo izrastanje i rast tijekom embrionalnog razvoja; nije pokazano da modulira kolateralizaciju eferentnih aksona mišjeg neokorteksa i ne utječe na zakretanje aksona. Također, *Sema5A* ima ulogu u razvoju vidnog živca (Goldberg, 2004.; Oster, 2003.), tumorigenezi i angiogenezi (Purohit i sur., 2014.), a haploinsuficijencija *SEMA5A* ima ulogu u poremećajima razvoja mozga (Weiss i sur., 2009.; Melin i sur., 2006.; Simmons i sur., 1998.).

Istraživanje mozga miševa kojima nedostaje *Sema5A* (*Sema5A* „knock-out“ miševi) sa bromodeoksiuridin (BrdU) datiranjem kortikalnih neurona pokazalo je abnormalnu kortikogenezu zbog nepravilne radijalne migracije kortikalnih neurona, koji zaostaju u intermedijalnoj zoni. S druge strane, kod miševa s prekomjernim izražajem *Sema5A* dolazi do prekomjernog broja kortikalnih neurona u marginalnoj zoni korteksa (Chivatakarn, 2008).

Receptor visokog afiniteta i specifičnosti za Sema5A je pleksinB3, protein iz obitelji pleksina, semaforinskih receptora. I sema domena i trombospondinska ponavljanja tipa 1 među-djeluju sa pleksinomB3. Oligomerizacija sema domene nužna je za funkcionalni odgovor preko pleksinB3 receptora (Purohit i sur., 2014.). Sema5A specifično djeluje sa pleksinomB3, kojim može potaknuti signalni put Met tirozin kinaze, kroz koju aktivira više funkcionalnih odgovora u stanicama, potičući odbijajuće ili privlačne signale (Artigiani i sur., 2004.).

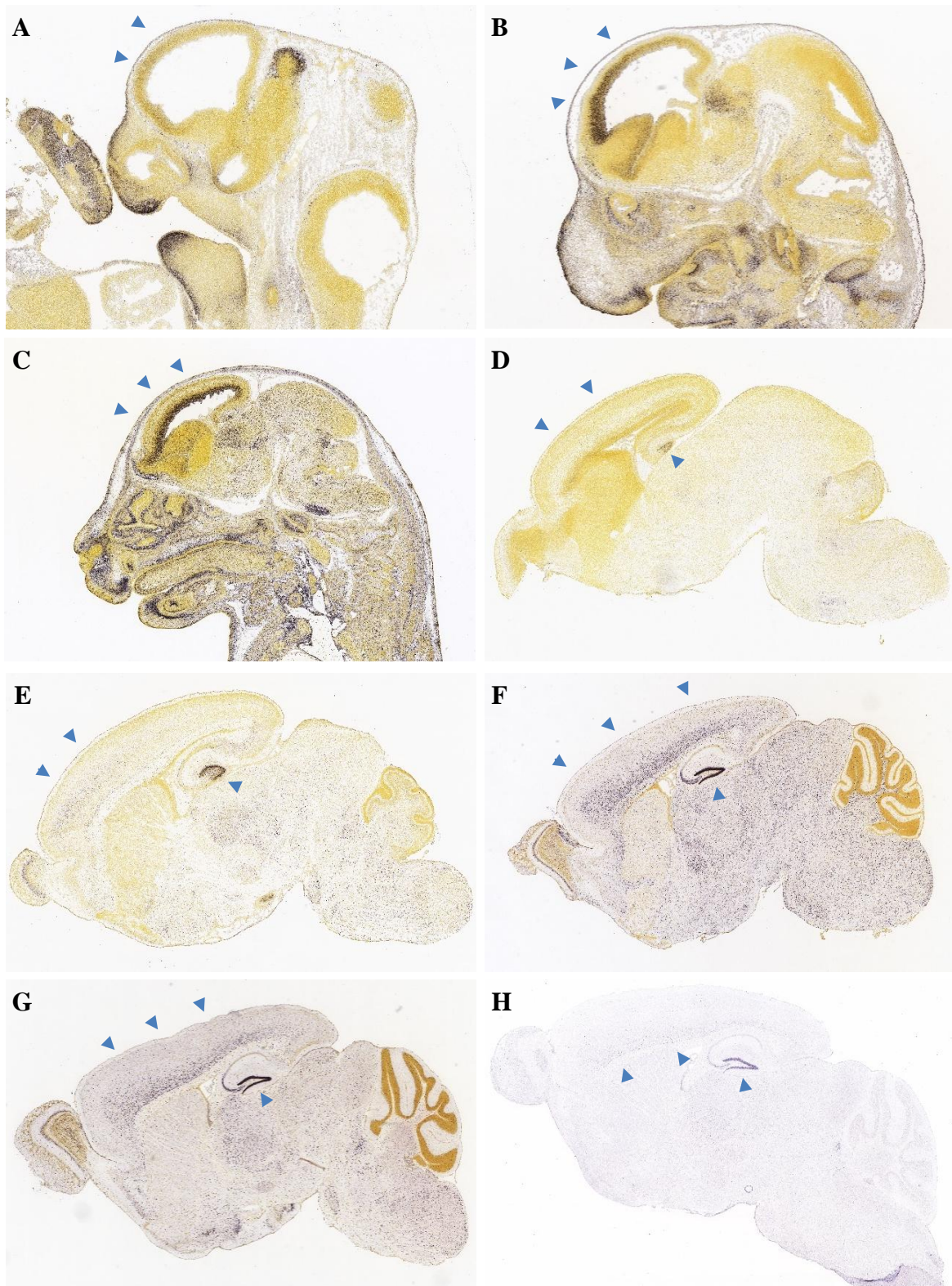
## **1.6. Izražaj mRNA *Sema5A* u neokorteksu glodavaca tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja**

Skaliora i sur. (1998.) su analizirali prostorni i vremenski izražaj transkripata semaforina, među kojima i semaforina5A tijekom razvoja mozga štakora, koristeći *in situ* hibridizaciju, kako je prikazano u Tablici 1. Razvoj korteksa veoma je sličan kod štakora i miša, uz razliku od jednog do dva dana ranije pojave razvojnih događaja kod miša (Molnar i sur. 1998). Gestacija kod štakora traje 20-21 dan, a kod miša traje 18-19 dana.

Analiza mRNA transkripata semaforina5A u mozgu miša prema bazi podataka Allen Brain Atlas, Allen instituta (Slika 7.) pokazuje da je izražaj *Sema5A* u telencefalonu najjači dana E15.5, uz nešto slabiji izražaj tijekom dana P14. Prema ovom izvoru dana E18.5 mRNA transkripti nisu očitljivi. To se jasno može vidjeti i na sagitalnim prerezima mozga na kojima je rađena *in situ* hibridizacija (Slika 6.). Slabi izražaj *Sema5A* u VZ telencefaličkog mjehurića se javlja dana E11.5, postaje jasno vidljiv dana E13.5 i sve je izraženiji do dana E15.5. Nakon toga u VZ signal slabi i dana E18.5 transkripti *Sema5A* nisu očitljivi. U tom razdoblju vidljiv je izražaj *Sema5A* u *dentatnom gyrusu* hipokampusa i na dalje je *Sema5A* kontinuirano izražen u hipokampusu. U diferencirajućem neokorteksu se izražaj *Sema5A* javlja dana P4 u V., VI.a i VI.b sloju. Četrnaestog postnatalnog dana transkripti *Sema5A* su izraženiji u VI.a i VI.b sloju neokorteksa. Slabiji izražaj jednake prostorne raspodjele vidljiv je dana P28. Izražaj *Sema5A* dalje slabi te je dana P56, uz hipokampus, vidljiv samo u VI.b sloju (Allen Institute for Brain Science, 2008.)

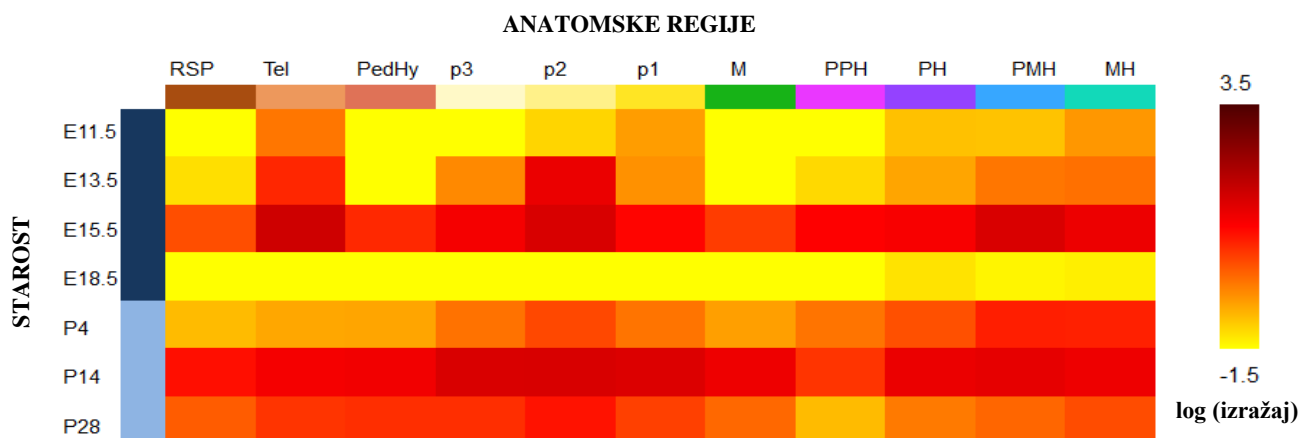
**Tablica 1.** Prostorno vremenska raspodjela izražaja mRNA semaforina5A u neokorteksu miša i štakora (Simmons i sur., 1998.; Skaliora i sur., 1998.). CP – kortikalna ploča, E – embrionalni dan, IZ – intermedijalna zona, P – postnatalni dan, SP – subplate, SVZ – subventrikularna zona, VZ – ventrikularna zona, WM – bijela tvar.

Starost		Prostorna raspodjela mRNA Sema5A tijekom razvoja mozga
Miš	Štakor	
<b>E12.5</b>	<b>E14.5</b>	EMBRIONALNI NEOKORTEKS – pojava izražaja u VZ anteriornog dijela telencefaličkog mjehurića
<b>E13</b>	<b>E15</b>	EMBRIONALNI NEOKORTEKS – jaki izražaj u VZ, javlja se izražaj u CP BAZALNI TELENCEFALON – izražaj u germinativnoj ventrikularnoj zoni TALAMUS – izražaj <i>Sema5A</i> jasno ocrtava anteriorni i intermedijalni talamus, uključujući postraničnu koljenastu jezgru i ventrobazalni jezgreni kompleks
<b>E15</b>	<b>E17</b>	EMBRIONALNI NEOKORTEKS – naglašen izražaj u CP i VZ koji ograničava IZ bez transkripata i formirajuću bijelu tvar TALAMUS – javlja se izražaj u dorzomedijalnom talamusu
<b>E16- E17</b>	<b>E18- E19</b>	EMBRIONALNI NEOKORTEKS – jaki izražaj u SP dorzomedijalnog korteksa; izdvajanjem SVZ, izražaj <i>Sema5A</i> ostaje ograničen na VZ
<b>E17</b>	<b>E19</b>	TALAMUS – izražaj u većem dijelu dorzomedijalnog talamusa, uključujući postraničnu koljenastu jezgru i ventrobazalni jezgreni kompleks HIPOKAMPUS – pojava izražaja u <i>dentatnom gyrusu</i> , subikularnom području i u CA1 stanicama
<b>P0</b>	<b>P0</b>	POSTNATALNI KORTEKS – u neuroepitelu koji je značajno smanjen nestaje izražaj; pojava izražaja u diferencirajućim slojevima korteksa (prvo u infragranularnim, zatim u supragranularnim slojevima); jaki signal u sredini i donjem dijelu sloja V anteriornog korteksa; pojava signala u VI sloju anteriornog korteksa; kontinuirani izražaj u SP, transkripti su ograničeni na SP dorzomedijalnog korteksa, odsutni na ventrolateralnim područjima kortikalne ploče; pojava ekspresije u kortikalnoj bijeloj tvari (WM)  BAZALNI TELENCEFALON – značajno smanjen izražaj u VZ, pojava signala u periretikularnoj jezgri (PRN)  HIPOKAMPUS – jaki izražaj na granici subiculuma i CA1 stanica, slabi prema CA3 stanicama
<b>P2</b>	<b>P2</b>	POSTNATALNI KORTEKS – signal u VI sloju proširen na cijeli anteroposteriorni dio korteksa; signal u donjem dijelu V sloja i u SP, najviše u dorzomedijalnom cingulatnom korteksu, lateralnije su transkripti homogeno distribuirani u V sloju, a u VI sloju tvore diskretne stupiće koji se prostiru anteriornim i centralnim kortikalnim regijama (budući somatosenzorički korteks); jači izražaj u WM, pojačava se sazrijevanjem  TALAMUS – nestaje izražaj iz strijatalnog epitela; jači izražaj u PRN i unutarnjoj čahuri; izražaj ostaje na visokoj razini  HIPOKAMPUS – izražaj nestaje iz subiculuma



**Slika 6.** Izražaj mRNA semaforina5A na sagitalnim prerezima mozga miša: A) E11,5. dan; B) 13,5. dan; C) 15,5. dan; D) 18,5. dan; E) P4. dan; F) P14. dan; G) P28. dan; H) P56. dan. (prilagođeno prema <http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/20119>)





**Slika 7.** Izražaj mRNA semaforina5A od E11,5. dana do P28. dana kroz različite anatomske regije mozga miša. Razina izražaja predstavljena je skalom obojenja, što je jači izražaj boja je tamnija crvena, a što je izražaj slabiji boja je svjetlija žuta. U telencefalonu je vidljiv najjači izražaj E15,5. dana, uz jaki izražaj P14. dana, dok izražaja nema E18,5. dana. RSP – rostralni sekundarni prosencefaloni; Tel- telencefalički mjehurić; PedHy – kaudalni hipotalamus; p3/2/1 – prosomera 3/2/1; M – međumozak; PPH – predponsni stražnji mozak; PH – ponsni stražnji mozak; PMH – ponsomedularni stražnji mozak; MH – medularni stražnji mozak. (prilagođeno prema <http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/20119>)

## 1.7. Dvojna priroda Sema5A

Jedna od funkcija semaforina5A je njegova uloga u navođenju određenih populacija aksona. Kao navodilačka molekula aksona dvojne prirode, Sema5A u *in vitro* uvjetima pokazuje pozitivne i negativne kemotaksijske efekte na rastuće aksone *fasciculusa retroflexusa* (*tractus habenulopeduncularis*), snop živčanih vlakana iz habenule diencefalona (Kantor i sur., 2004.). Glikozaminoglikani iz ekstracelularnog matriksa (ECM) vežu se na trombospondinska ponavljanja Sema5A i utječu na privlačenje ili inhibiciju rastućih aksona od strane Sema5A. Hondroitin-sulfat proteoglikani (eng. *chondroitin sulfate proteoglycans*, CSPG) potiču inhibitorni učinak Sema5A, a heparan-sulfat proteoglikani (eng. *heparan sulfate proteoglycans*, HSPG) potiču privlačni učinak Sema5A. Iako je sema domena nužna za inhibitorni učinak Sema5A, trombospondinska ponavljanja su ta koja međudjeluju s glikozaminoglikanskim dijelom hondroitin-sulfat i heparan-sulfat proteoglikana. Odgovor rastućeg čunjića aksona na Sema5A ovisi o sastavu proteoglikana. Dok CSPG mijenjaju privlačnu ulogu Sema5 u inhibitornu ulogu (Slika 5.), djelujući kao vanjski lokalizirani signali u ECM-u, moguće da su neki HSPG, najvjerojatnije syndecan-3, komponente receptora za Sema5A zbog svoje ekspresije na aksonima i rastućim čunjićima, gdje djeluju na privlačni utjecaj Sema5A. CSPG najvjerojatnije moduliraju odgovor rastućeg čunjića miješajući se u

interakciju između Sema5A i komponenti staničnog receptora (kao što su HSPG) i tako mijenjaju privlačni u inhibitorni odgovor (Kantor i sur., 2004.).

## **1.8. Uloga Sema5A u razvoju vidnog živca i retine**

Aksoni retinalnih ganglijskih stanica (RGC) formiraju vidni živac, koji prenosi informacije iz retine do središnjeg živčanog sustava. Usmjerenje i rast aksona tijekom razvoja vidnog živca moduliraju molekule L1, laminin i netrin 1. Uz navedene molekule, neuroepitel koji okružuje rastući vidni živac, specifično izražava i semaforin5A. Sema5A izaziva inhibitorni odgovor RGC aksona i sprječava defascikulaciju vidnog živca, regulirajući tako njegov pravilan razvoj (Oster, 2003.). *In vitro* istraživanja su pokazala da u vidnom živcu semaforin5A izražavaju i oligodendrociti i njihovi prekursori. Konstitutivan izražaj semaforina5A izaziva kolaps rastućih čunjića RGC aksona i inhibira njihov rast. To omogućava pravilan razvoj vidnog živca, ali i inhibira RGC regeneraciju nakon ozljede u odraslom vidnom živcu (Goldberg, 2004.).

Neuronski krugovi u retini su organizirani u dvije sinaptičke regije, vanjski i unutarnji mrežasti sloj. U njihovoj pravilnoj organizaciji sudjeluju Sema5A i Sema5B, inhibirajući prerastanje retinalnih aksona u unutarnjem mrežastom sloju. Zajedno s receptorima pleksinomA1 i pleksinomA3, čiji je izražaj komplementaran Sema5A i Sema5B u retini, omogućuju uspostavljanje unutarnje retinalne laminacije i sinaptičku povezanost između RGC, amakrinih i bipolarnih stanica (Matsuoka i sur., 2011.). Djelovanje Sema5A i Sema5B s receptorima pleksinomA1 i pleksinomA3 sugerira da uz navedeni funkcionalni receptor pleksinB3 (Artigiani i sur., 2004.) i drugi proteini iz obitelji pleksina imaju ulogu receptora za Sema5A.

## **1.9. Uloga SEMA5A u nastanku bolesti**

Ljudski gen *SEMA5A* se nalazi na kraćem p kraku kromosoma 5 (5p15.2), unutar „kritične regije“ lokusa sindroma „mačjeg“ plača (franc. *Cri-du-chat* sindrom, CDCS). Karakteristike sindroma poput monokromatskog plača visokog tona, mikrocefalije, širokog nosnog mosta i teške psihomotoričke i mentalne zaostalosti su posljedica segmentalne aneusomije. Dolazi do velikih delecija kraćeg p kraka, kromosoma 5, a unutar kritične regije uz katenin delta 2 (CTNND2) koji ima važnu ulogu u razvoju mozga (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1501>), dolazi i do delecije *SEMA5A*. Smatra se da haploinsuficijencija *SEMA5A* remeti normalan razvoj mozga i vodi nekim karakteristikama

CDCS-a zbog poremećene regulacije signala tijekom stvaranja postmitotičkih neurona. Time se značajno smanjuje broj novonastalih neurona. S druge strane, SEMA5A vjerojatno potiče proliferaciju neuronskih prekursora i njihovu migraciju iz VZ, a haploinsuficijencija time onemogućava pravilnu migraciju i organizaciju korteksa (Simmons i sur., 1998.).

Mnoga istraživanja potvrđuju vezu SEMA5A s autističnim poremećajem. Taj neurorazvojni poremećaj karakterizira poremećaj u socijalnoj interakciji, verbalnoj i neverbalnoj komunikaciji. Iako postoji mnogo faktora za koje se pretpostavlja da uzrokuju autistični poremećaj, smatra se da genetički faktori, nekoliko gena koji djeluju epistatički, imaju važnu ulogu u razvoju poremećaja. Potvrđen je smanjen izražaj gena SEMA5A, koji utječe na vođenje aksona, a sinaptička disfunkcija vrlo je vjerojatno etiološki mehanizam u autističnom poremećaju (Melin i sur., 2006.). Weiss i sur. (2009.) su također potvrdili smanjeni izražaj proteina i gena SEMA5A kod autističnih pacijenata, a Mosca-Boidron i sur. (2016.) zabilježili su mikrodeleciju SEMA5A kod autističnog pacijenta, koja je nastala zbog nebalansirane recipročne translokacije i uzrokovala gubitak sedam egzona koji kodiraju zadnjih pet trombospondinskih ponavljanja, transmembransku i citoplazmatsku domenu. GWAS studija (eng. *genome-wide association study*) istaknula je povezanost intergenskog SNP-a (eng. *single nucleotide polymorphism*) u blizini SEMA5A i smanjenog izražaja gena SEMA5A. Pokazala je preklapanje SEMA5A regulatorne mreže s drugim genima za koje se smatra da su ključni u autističnom poremećaju i zaključuje da je modulacija izražaja SEMA5A važna u toj genskoj regulatornoj mreži (Cheng i sur., 2013.).

Pokazalo se da SEMA5A preko pleksin-B3 receptora inhibira invaziju stanica ljudskog glioma, inhibira pokretljivost stanica glioma smanjujući aktinska stresna vlakna i otežava fokalnu adheziju posredovanu vinkulinom i potiče diferencijaciju astrocita. Ti rezultati podupiru ulogu SEMA5A kao tumor supresora u gliomu čovjeka (Purohit i sur., 2014.).



## 2. CILJ RADA

Opći cilj ovog istraživanja i diplomskog rada je utvrditi izražaj proteina semaforina5A na staničnoj, slojevnoj i strukturnoj histološkoj razini u telencefalonu miša tijekom ranog postnatalnog razvoja.

Specifični ciljevi su kvalitativno i prostorno usporediti razinu izražaja proteina u dvije razvojne vremenske točke (P5 i P15) korištenjem indirektna imunohistokemijske metode i usporediti s do sada poznatim izražajem mRNA *Sema5A*, kako bi došli do novih spoznaja o ulozi proteina Sema5A tijekom razvoja mozga.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Životinje

Za potrebe istraživanja su korišteni miševi soja C57BL/6 (Van De Werd i sur., 2010.), dobi P5 i P15 dana, uzgajani na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Za istraživanje je uzeto 5 jedinki svake postnatalne dobi. Korištenje životinja i protokola za uzorkovanje mozga rađeno je prema Etičkom kodeksu Ministarstva znanosti i obrazovanja RH (MARC, HRPOK006).

#### 3.1.2. Kemikalije

- Narkamon (100 mg/ml, Bioveta, Češka Republika)
- Xylased bio (20 mg/ml, Bioveta, Češka Republika)
- fosfatni pufer (PBS)
- 4 % NB formaldehid (Biognost, Republika Hrvatska)
- destilirana H<sub>2</sub>O
- saharoza, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (Kemika, Republika Hrvatska)
- metilbutan
- Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek Europe, Nizozemska)
- metanol, CH<sub>3</sub>OH
- vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)
- 5 % BSA (Bovine Serum Albumin = goveđi serumski albumin; Sigma-Aldrich, SAD)
- 0.5 % triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD)
- Poly-Mount (Polysciences, SAD)
- Clear-Advantage Xylene Substitute (Polysciences, SAD)
- Cresyl violet
- 10 % octena kiselina, CH<sub>3</sub>COOH
- etanol (70 %, 96 %, 100 %)
- Anti-Semaphorin5A primarno protutijelo, ab70981, kuničje IgG poliklonsko protutijelo (Abcam, Velika Britanija)

- VECTASTAIN ABC kit, Peroxidase Rabbit IgG, PK-4001 (Vector Laboratories, SAD)
  - anti-kuničje IgG poliklonsko sekundarno protutijelo
  - ABC reagent A + B (avidin + biotin)
- SIGMAFAST DAB with Metal Enhancer (Sigma-Aldrich, SAD)

### **3.1.3. Pribor i pomagala**

- kirurški pribor
- šprice
- igle
- falcon epruvete 15 ml
- kriostat (Leica CM3000, GMI, SAD)
- cell culture plate, 12-well (Eppendorf, Njemačka)
- mikropipete (Eppendorf, Njemačka)
- analitička vaga (1212M SCS, Precisa Gravimetrics AG, Švicarska)
- miješalica (Orbit LS, Labnet International, SAD)
- vorteks (PV-1, Grant Instruments, Velika Britanija)
- magnetska mješalica (Rotamix 550 MMH, Tehnica, Slovenija)
- lupa
- predmetna stakalca (Vitrognost, Biognost, Republika Hrvatska)
- pokrovnna stakalca (LLG-Labware, Njemačka)
- mikroskop (Nikon, Alphaphot-2 YS2, Japan)
- mikroskop (Olympus AX70 Provis, Japan)
- controle software ACT 1 (Nikon, Japan)
- hladnjak (+4 °C)
- zamrzivač (-20 °C)
- zamrzivač (-80 °C)

## **3.2. Metode**

Parenje jednog mužjaka i četiri ženke omogućeno je u intervalu do 24 sata, a slijedeći dan do 12 sati smatran je nultim embrionalnim danom (E0). Nultim postnatalnim danom (P0) smatran je dan rođenja miševa do 12 sati.

### **3.2.1. Fiksacija tkiva transkardijalnom perfuzijom**

Miševi starosti P5 i P15 dana su duboko anestetizirani kombinacijom anestetika i analgetika ketamina i ksilazina (1 ml Narkamon + 0,5 ml Xylased + 8,5 ml dH<sub>2</sub>O) u dozi od 0.1 mL/10g koja je aplicirana intraperitonealno. Kako bi odredili dubinu anestezije, životinjama smo provjerili medijalni i lateralni palpebralni refleksi. Nakon izostanka odgovora, provjerili smo refleks duboke boli pritiskanjem zadnje trećine repa i kože između prstiju. Kada smo utvrdili da je jedinka u dubokoj anesteziji, provela se transkardijalna perfuzija sa 1x PBS-om i 4 % formaldehidom (PFA) prema Gage i sur. (2012.). Rezom kroz abdomen uz duž dijafragme, kroz dijafragmu i lateralno kroz svaku stranu prsnog koša uzduž rebara, otvorili smo prsni koš i fiksirali tako da dobro vidimo srce. Iglom smo ušli u lijevi ventrikul srca i počeli ispuštati PBS su krvotok. Zatim smo prerezali desni srčani atrij kako bi krv i tekućina mogle istjecati. Nakon ispiranja PBS-om i kada smo primijetili da je životinja isprana od krvi, PBS smo zamijenili sa PFA. Za miševe stare 5 dana smo koristili 5 ml 1x PBS i 10 ml 4 % PFA po jedinki, a za miševe stare 15 dana smo upotrijebili 10 ml 1x PBS i 20 ml 4 % PFA po jedinki. Perfuzija je bila uspješna kada bi primijetili grčenje mišićne mase prednjih i stražnjih ekstremiteta, repa te blijeđe šape i njuške. Blijedenje njuške životinje upućivalo je na prodiranje fiksativa u glavu i mozak. Nakon perfuzije smo dekapitali jedinku i izolirali mozak, pazeći da prilikom izolacije ne dođe do oštećenja tkiva. Ekstrahirani mozgovi su fiksirani imerzijom u 4 % PFA i ostavljeni preko noći na +4 °C. Drugog dana pripremljena je 20 % otopina saharoze u koju su uzorci premješteni i čuvani na +4 °C. Nakon što su uzorci potonuli na dno falkon epruveta, slijedećeg dana, pripremljena je 30 % otopina saharoze u koju su uzorci premješteni. Nakon potonuća na dno epruveta, uzorci su pohranjeni krioprotekcijom metilbutanom na -80 °C do nastavka analize.

### 3.2.2. Izrada histoloških preparata

Krioprezervirani uzorci su premješteni iz zamrzivača (-80 °C) u kriostat (-25 °C). Svaki uzorak je pomoću sredstva Tissue-Tek OCT fiksiran na podlogu za rezanje i orijentiran olfaktornim bulbusima prema gore kako bi dobili koronarne rezove. Tako fiksirani uzorci su rezani u kriostatu na CT -25 °C, OT -19 °C. Razina koju smo pratili prilikom rezanja počinjala je pojavom kompletno spojenog *corpus callosum* i pojavom lateralnih ventrikula (2.79 mm prema Paxinos i sur., 2007.), a završavala je pojavom dobro razvijenog hipokampusa (pojava CA3 stanica) (4.47 mm prema Paxinos i sur., 2007.). Po uzorku smo dobili oko 25 koronarnih rezova debljine 60 µm. Rezove smo stavljali u 1x PBS, po 4 reza u jednu jažicu na pločice za kulture stanica s 12 jažica kako bi dalje radili *free-floating* indirektno imunohistokemijsko bojanje.

### 3.2.3. Indirektna imunohistokemija – avidin-biotin kompleks (ABC) metoda

Kako bi pripravili rezove za bojanje ABC metodom (Ramos-Vara i Miller, 2014.; Jovanov, 2001.), prvo smo ih isprali u jažicama 3 puta po 10 minuta u 1x PBS-u. Isprane rezove smo zatim premjestili u jažice s otopinom za pred tretman na 30 minuta, koju smo pripravili od 75 ml metanola (CH<sub>3</sub>OH), 25 ml dH<sub>2</sub>O i 75 µl 30 % vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Pred tretman nam omogućuje da blokiramo endogene peroksidaze u stanicama kako spriječili nespecifično reagiranje sa supstratom. Rezove smo zatim ponovno ispirali 3 puta po 10 minuta u 1x PBS-u. Nakon ispiranja smo rezove premjestili u otopinu za blokiranje na 1 sat, kako bi spriječili nespecifično vezanje sekundarnog protutijela. Otopinu za blokiranje smo pripravili sa 5 % goveđeg serumskog albumina (BSA) i 0,5 % Tritonom u PBS-u. Zatim smo rezove stavili u primarno protutijelo Anti-Semaphorin5A (Abcam) razrijeđeno 1:1000 u 5 % BSA blokirajućoj otopini za miševе starosti P15 i 1:1500 za miševе starosti P5. Rezove smo tako ostavili preko noći na +4 °C. Drugog dana smo rezove prvo isprali 3 puta po 10 minuta u 1x PBS-u i zatim prebacili u sekundarno protutijelo na 1 sat. Koristili smo Vectastain ABC kit, čije smo sekundarno protutijelo razrijedili 1:200 u 2.5 % BSA blokirajućoj otopini. Slijedilo je ispiranje rezova u 1x PBS-u 3 puta po 10 minuta, nakon čega smo rezove prebacili u kompleks avidina i biotina iz Vectastain ABC kita na 1 sat.. Za 1 ml avidin+biotin kompleksa smo koristili 5 µl avidina, 5 µl biotina i 990 µl blocking otopine. Zatim smo

ponovno isprali rezove 3 puta po 10 minuta u 1x PBS-u. Isprane rezove smo prebacili u otopinu za razvijanje s 3,3'-diaminobenzidinom koju smo pripremili od SIGMAFAST DAB tableta sa metalnim pojačivačem. Razvijanje rezova je trajalo dok nismo dobili željenu jačinu obojenja, oko 2 minute za P15 miševe i oko 4 minute za P5 miševe. Kada su rezovi potamnili do željene razine, isprali smo ih ponovno 3 puta po 10 minuta u 1x PBS-u. Obojane i isprane rezove smo zatim navukli na predmetna stakalca i ostavili da se suše na zraku preko noći. Slijedećeg dana smo rezove na stakalcima uronili u kadicu sa Clear-Advantage Xylene Substitute 2 puta po 10 minuta, kako bi isprali rezove i nakon toga ih pokrili pokrovnim stakalcima pomoću Poly-Mount sredstva za pokrivanje. Prilikom svakog pokusa radene su negativne kontrole kod kojih smo primarno protutijelo zamijenili otopinom za blokiranje kako bi provjerili da reagensi nisu kontaminirani te da se sekundarno protutijelo ne veže nespecifično. Niti jedna kontrola nije pokazala imunohistokemijsko obojenje.

#### **3.2.4. Bojanje po Nisslu**

Kako bi prikazali citoarhitekturu mozga koristili smo metodu bojanja Cresyl-violet po Nisslu. Rezove smo navukli na predmetna stakalca i ostavili sušiti 24 sata na zraku. Osušene rezove smo drugi dan na stalku uronili u kadicu s Cresyl violet bojom na 10 minuta. Kako bi mogli bolje razlučiti tkivo, suvišak boje sa stakalaca smo zatim isprali u destiliranoj vodi. Zatim smo u dva navrata ispirali stakalca u 70 % etanolu uz dodatak par kapi 10 % octene kiseline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Nakon toga smo ispirali stakalca u 96 % etanolu dva puta pa u 100 % etanolu, također dva puta. Na kraju smo stakalca uronili u Clear-Advantage Xylene Substitute u dva navrata i pokrili Poly-Mountom i pokrovnim stakalcem.

#### **3.2.5. Analiza i fotografiranje preparata**

Preparate smo kvalitativno analizirali standardnim svjetlosnim mikroskopom, koncentrirajući se na slojeve korteksa. Najbolje preparate smo fotografirali pod različitim povećanjima na mikroskopu Olympus AX70 Provis pomoću digitalne kamere Nikon DXM1200 u programu Nikon ACT 1. U vidnom polju smo podesili kontrast i svjetlinu, a pomoću ACT 1 programa smo prilagodili razlučivost, osjetljivost i balans bijele boje. Dobivene fotografije su dimenzija 65,02 cm (širina) × 52,02 cm (visina); rezolucije 150

piksel/inč i dimenzije u pikselima 3840 (širina) × 3072 (visina). Pomoću programa ImageJ na fotografijama smo napravili mjerke kako bi prikazali odnos veličina. Pomoću programa Microsoft Publisher prilagodili smo veličine fotografija preparata, a korištenjem GIMP 2.8 programa uredili smo slike koje prikazuju strukturu mišjeg mozga.

**Tablica 2.** Mjerka za mikroskopske fotografije

<b>POVEĆANJE</b>	<b>MJERKA</b>	<b>STVARNA VELIČINA</b>
<b>1,25 x</b>	500 μm	3,5 cm
<b>4 x</b>	500 μm	11,25 cm
<b>10 x</b>	100 μm	5,65 cm
<b>20 x</b>	50 μm	5,65 cm
<b>40 x</b>	50 μm	11,3 cm

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Izražaj semaforina5A u korteksu miša**

Kvalitativna analiza izražaja semaforina5A na koronarnim rezovima mozgovog miševa starih 5 i 15 dana obuhvaćala je dijelove neokorteksa: cingularni, motorički, somatosenzorički i insularni korteks; dio paleokorteksa, piriformni korteks; i dio arhikorteksa, hipokampus. Za prikaz citoarhitektonike mozga i usporedbu slojeva korteksa su korišteni susjedni koronarni rezovi mozgovog miševa, bojani po Nisslu. Također, za usporedbu struktura mozga korišten je Atlas mozga miša u razvoju (Paxinos i sur., 2007.) starosti P6, atlas Mozak miša u stereotaksijskim koordinatama (Paxinos i Franklin, 2004.) i atlas mozga odraslog miša s Allen instituta (Allen Institute for Brain Science, 2008.).

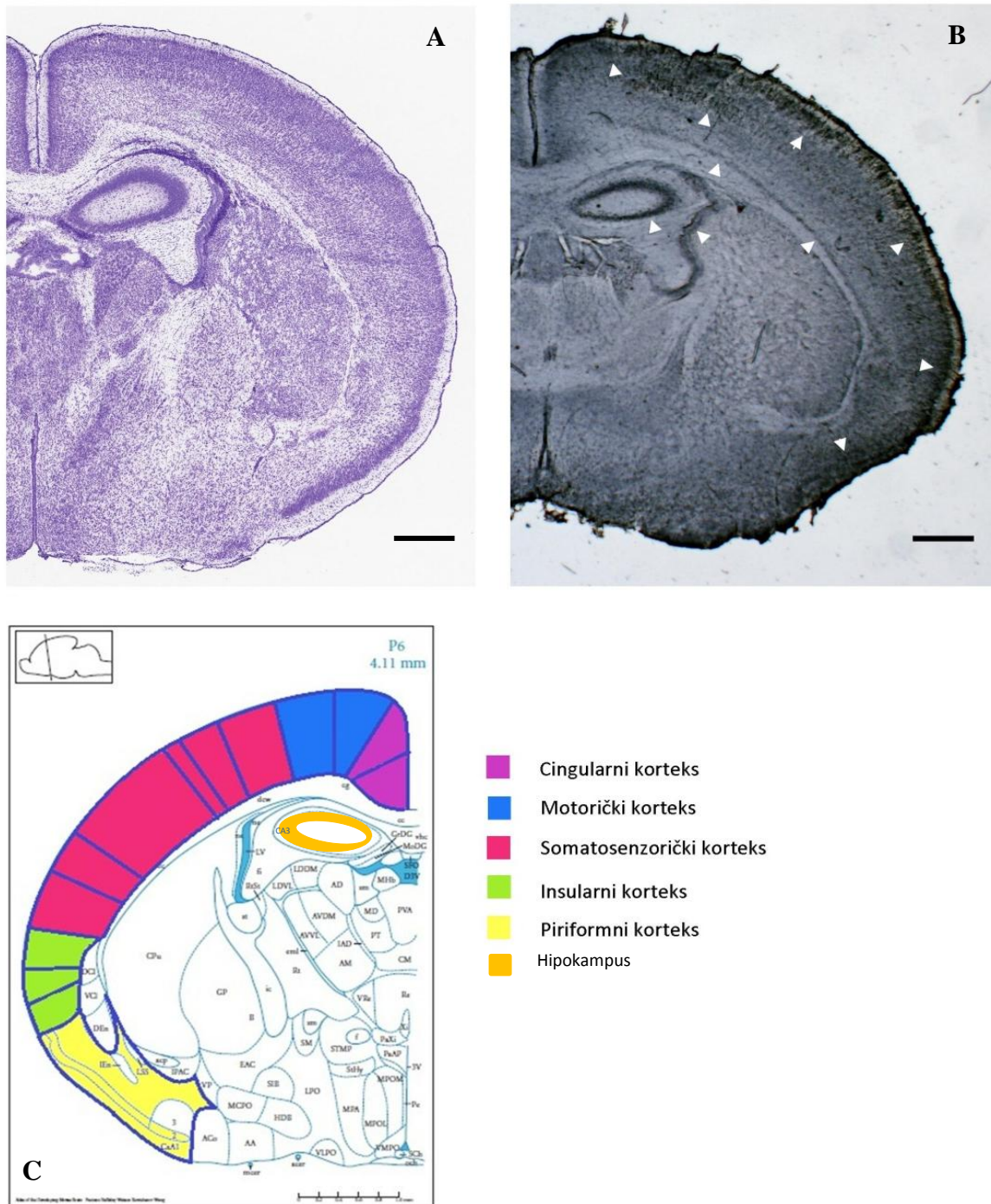
### **4.2. Izražaj Sema5A proteina u mozgu miša petog postnatalnog dana**

Uspoređeni su koronarni presjeci cerebruma miševa 5. postnatalnog dana, bojani imunohistokemijskom metodom za Sema5A (Slika 8.B) s prevezima bojanim metodom po Nisslu (Slika 8.A) i sa shematskim prikazom organizacije mozga miša (Slika 8.C). Izražaj proteina Sema5A jasno je vidljiv u II./III. i VI.b sloju moždane kore uz naznaku obojenja i u V. sloju u pojedinim moždanim regijama (Slika 8.B, označeno strelicama). Uspoređujući dorzo-medijalni dio cerebruma bojan metodom po Nisslu (Slika 9.A) i imunohistokemijski za Sema5A (Slika 9.B), primjećujemo izražaj Sema5A u motoričkom i somatosenzoričkom korteksu i u hipokampusu. U cingularnoj regiji u korteksu nema jasnog izražaja Sema5A ni u jednom sloju (Slika 9.C). Iako slabije izraženo, Sema5A imunoreaktivnost je prisutna u II./III. i V. sloju motoričkog korteksa (Slika 9.D). Jasno izražena imunoreaktivnost prisutna je duž somatosenzoričkog korteksa u II./III., V. i VI.b sloju (Slika 9.E), te se jasno vidi obojenje stanica koje pokazuju morfologiju neurona (Slika 9.G, označeno strelicama). Izražaj Sema5A proteina lociran je perinuklearno i citoplazmatski u piramidalnom sloju CA3 stanica hipokampusa dok transmembranski izražaj nije jasno vidljiv obzirom na zbijenost stanica piramidalnog sloja (Slika 9.F, označeno strelicama). Uspoređujući ventro-lateralni dio cerebruma bojan imunohistokemijski za Sema5A (Slika 10.A) i metodom po Nisslu (Slika 10.B), vidimo izražaj Sema5A u insularnom i piriformnom korteksu. U insularnom korteksu je Sema5A imunoreaktivnost prisutna u II./III. Sloju (Slika 10.C), a u piriformnom korteksu u 2. sloju (Slika 10.D).

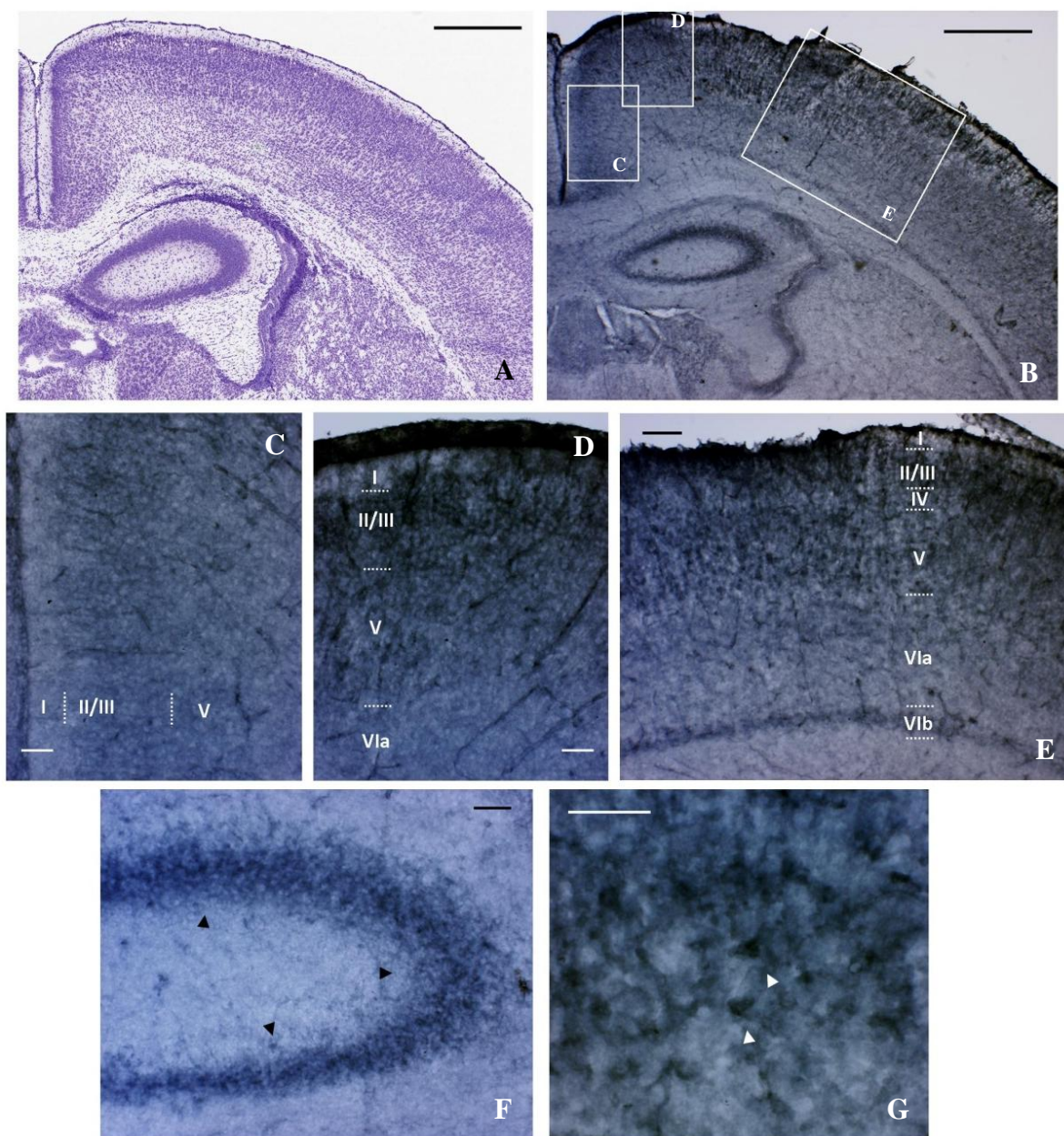


### **4.3. Izražaj Sema5A proteina u mozgu miša petnaestog postnatalnog dana**

Koronarni presjek cerebruma miša dobi P15 dana bojan imunohistokemijskom metodom za Sema5A (Slika 11.B) je uspoređen s presjekom bojanim metodom po Nisslu (Slika 11.A) i sa shematskim prikazom organizacije mozga miša (Slika 11.C). Vidljiv je izražaj Sema5A proteina u neuronima II./III. i V. sloja, ali ne i VI.b sloja korteksa (Slika 11.B, označeno strelicama). Uspoređivanjem shematskog prikaza slojeva cingularnog i motoričkog korteksa (Slika 12.A) sa presjecima cingularnog korteksa (Slika 12.B) i motoričkog korteksa (Slika 12.D) odredili smo slojeve korteksa. Na presjeku bojanom imunohistokemijskom metodom za Sema5A nema reaktivnosti u cingularnom korteksu (Slika 12.C i F), kao i kod P5 miševa. U motoričkom korteksu prisutan je jasan izražaj transmembranskog Sema5a u II./III. sloju korteksa (Slika 12.E), s vidljivim perisomatskim obojenjem stanica koje imaju morfologiju neurona (Slika 12.G, označeno bijelim strelicama). Također, na preparatima je vidljivo perivaskularno obojenje krvnih žila koje je najuočljivije na Slici 12. E i G, označeno crnim strelicama. Shematski prikaz (Slika 13.A) i presjek bojan metodom po Nisslu (Slika 13.B) prikazuju slojeve somatosenzoričkog korteksa. Na presjeku bojanom imunohistokemijski za Sema5A je jasno vidljiv izražaj u II./III. i V sloju somatosenzoričkog korteksa (Slika 13.C). Izražaj Sema5A je jasniji u II./III. sloju (Slika 13.D), sa izraženim perisomatskim obojenjem stanica morfologije neurona (Slika 13.E) i slabije izraženi, ali prisutan u V. sloju somatosenzoričkog korteksa (Slika 13.F), sa slabijim perisomatskim obojenjem stanica morfologije neurona. Shematski prikaz insularnog i piriformnog korteksa (Slika 14.A) uz presjeke bojane metodom po Nisslu prikazuju slojeve insularnog (Slika 14.B) i piriformnog korteksa (Slika 14.E). Na presjecima bojanim imunohistokemijski za Sema5A vidljiv je izražaj u II./III. sloju, uz slabiju i raštrkanu imunoreaktivnost V. sloja insularnog korteksa (Slika 14.C) i u 2. sloju piriformnog korteksa (Slika 14.D). Izraženo je perisomatsko obojenje stanica insularnog korteksa (Slika 14.F) i piriformnog korteksa (Slika 14. G, označeno strelicama).

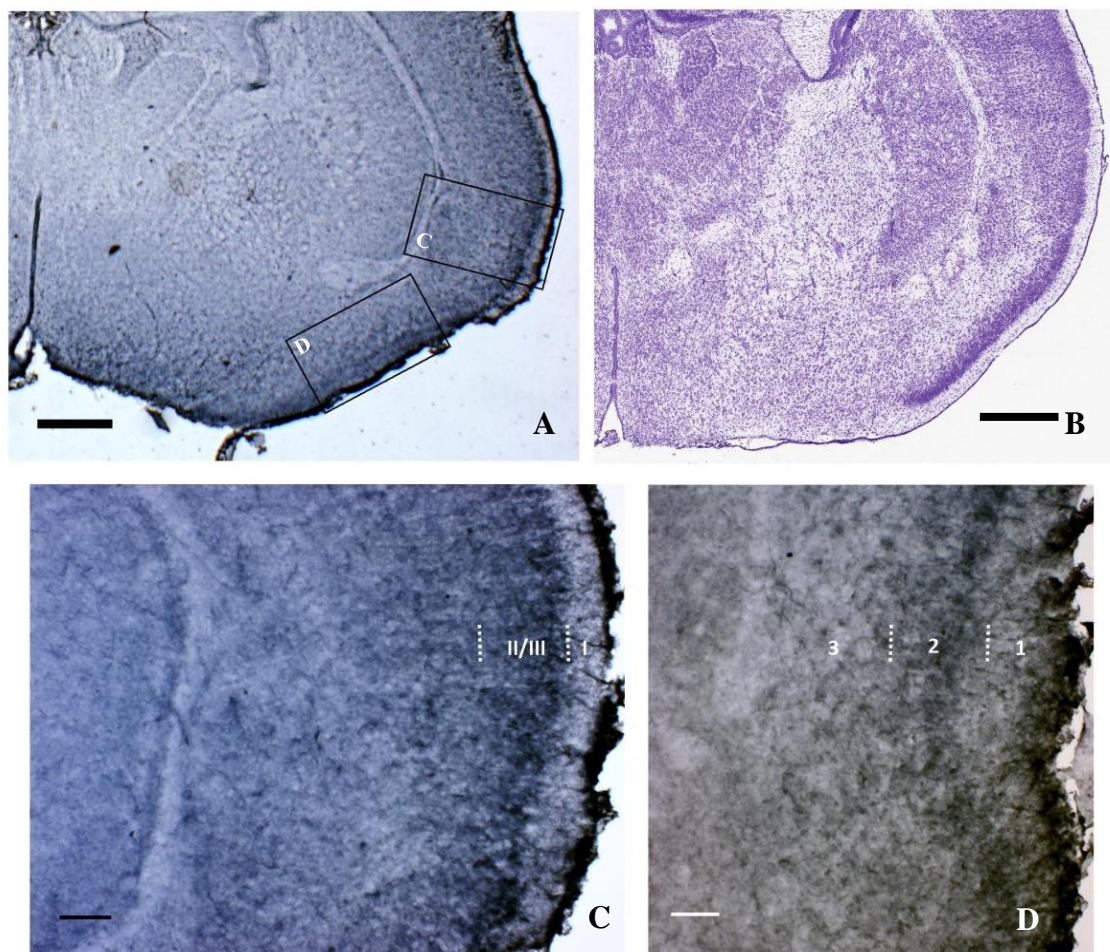


**Slika 8.** Koronarni presjek cerebruma miša starog P5 dana, obojan metodom po Nisslu (A) i imunohistokemijskom metodom za Sema5A (B). Bijele strelice označavaju imunoreaktivnost Sema5A u II./III. i V. sloju motoričkog korteksa, u II./III., V. i VI.b sloju somatosenzoričkog korteksa, u II./III. sloju insularnog korteksa, u 2. sloju piriformnog korteksa i u hipokampusu. Shematski prikaz organizacije mozga miša (prilagođeno prema Paxinos i sur., 2007.) (C). Mjerka = 500  $\mu$ m (A, B).

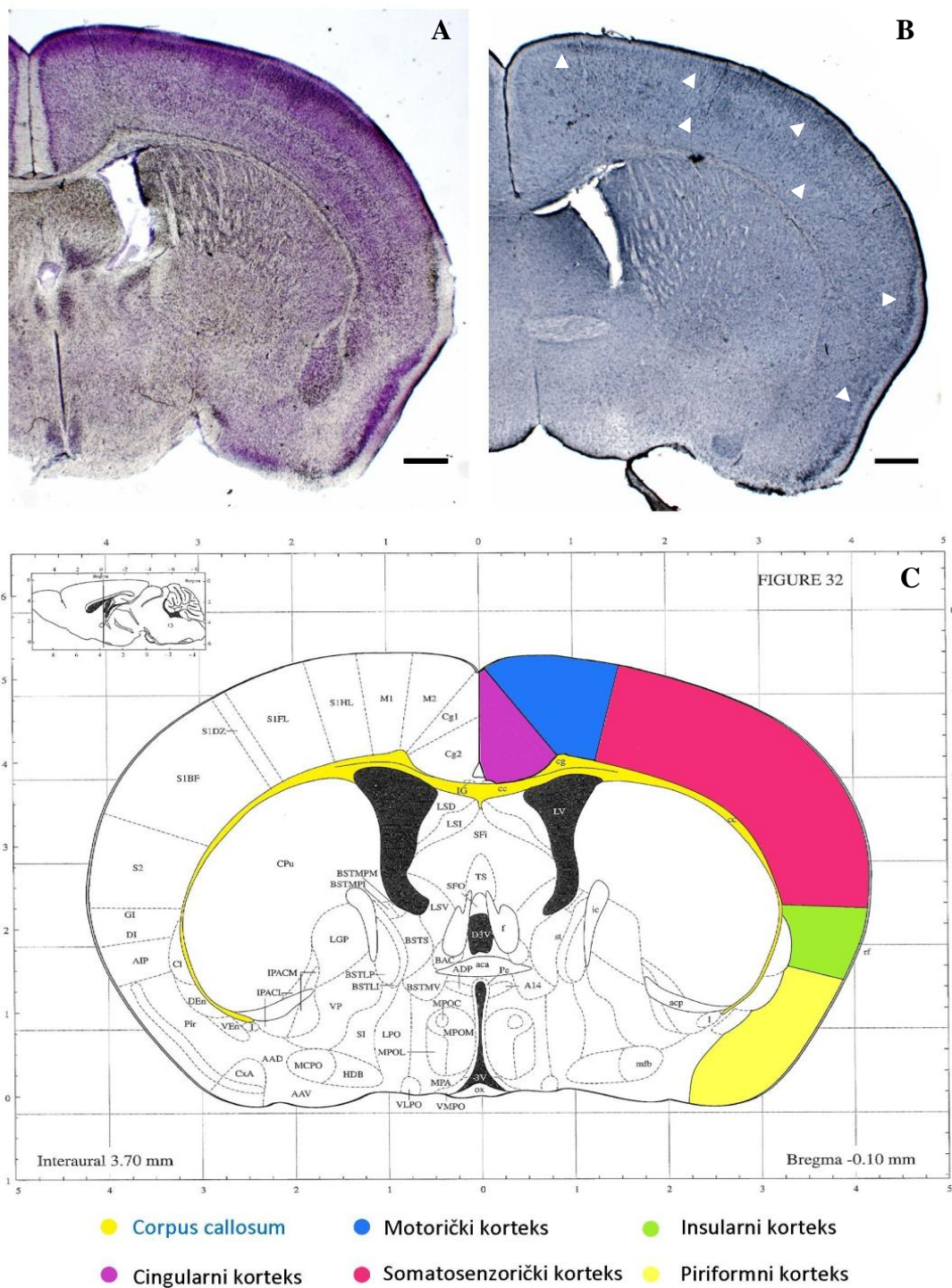


**Slika 9.** Koronarni presjek sa dorzo-medijalnim dijelom cerebruma miša starog P5 dana, koji pokazuje cingularni, motorički i somatosenzorički korteks te hipokampus, obojan metodom po Nisslu (A) i obojan imunohistokemijski za Sema5A (B). Kvadrati pokazuju uvećana područja: cingularnog korteksa bez imunoreaktivnosti (C), motoričkog korteksa sa slabije izraženom imunoreaktivnošću u II./III. i V. sloju (D), somatosenzoričkog korteksa sa izraženom imunoreaktivnošću u II./III., V. i VI.b sloju (E), hipokampusa s perinuklearnim i citoplazmatskim izražajem Sema5A u CA3 stanicama, označenih crnim strelicama (F), i somatosenzoričkog korteksa s perisomatskim obojenjem stanica V. sloja, koje imaju morfologiju neurona, označene bijelim strelicama (G). Mjerka = 500  $\mu$ m (A,B) ; 100  $\mu$ m (E); 50 $\mu$ m (C, D, F, G). Oznake slojeva = I, II/III, VI, V, VIa, VIb.



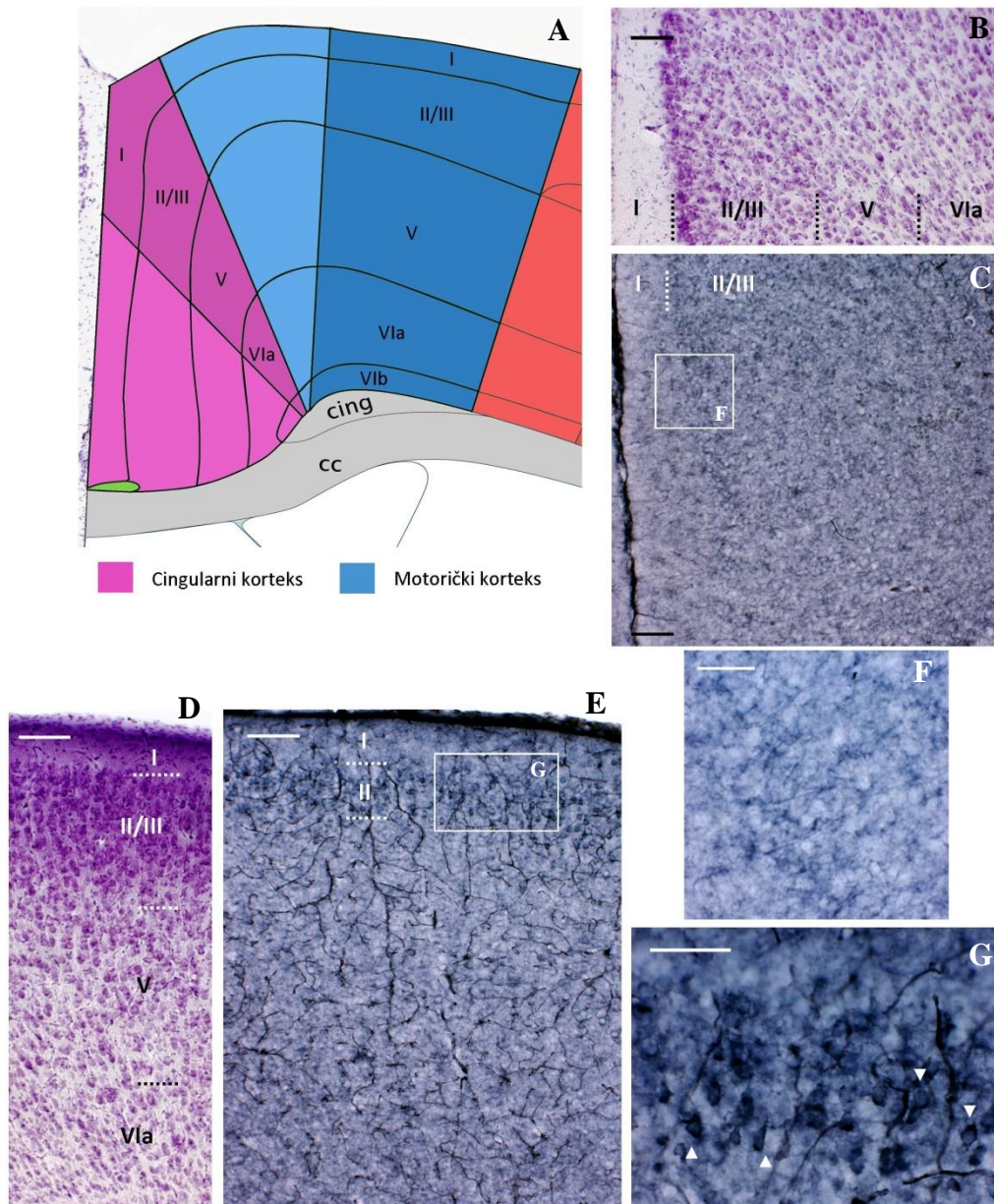


**Slika 10.** Koronarni presjek sa ventro-lateralnim dijelom cerebruma miša starog P5 dana, koji prikazuje insularni i piriformni korteks, obojan metodom po Nisslu (A) i imunohistokemijskom metodom za Sema5A (B). Kvadrati pokazuju uvećana područja: insularnog korteksa s imunoreaktivnošću u II./III.. sloju (C) i piriformnog korteksa, gdje je imunoreaktivnost vidljiva u 2. sloju (D). Mjerka = 500  $\mu\text{m}$  (A, B); 100  $\mu\text{m}$  (C, D). Oznake slojeva = I, II/III, 1, 2, 3.

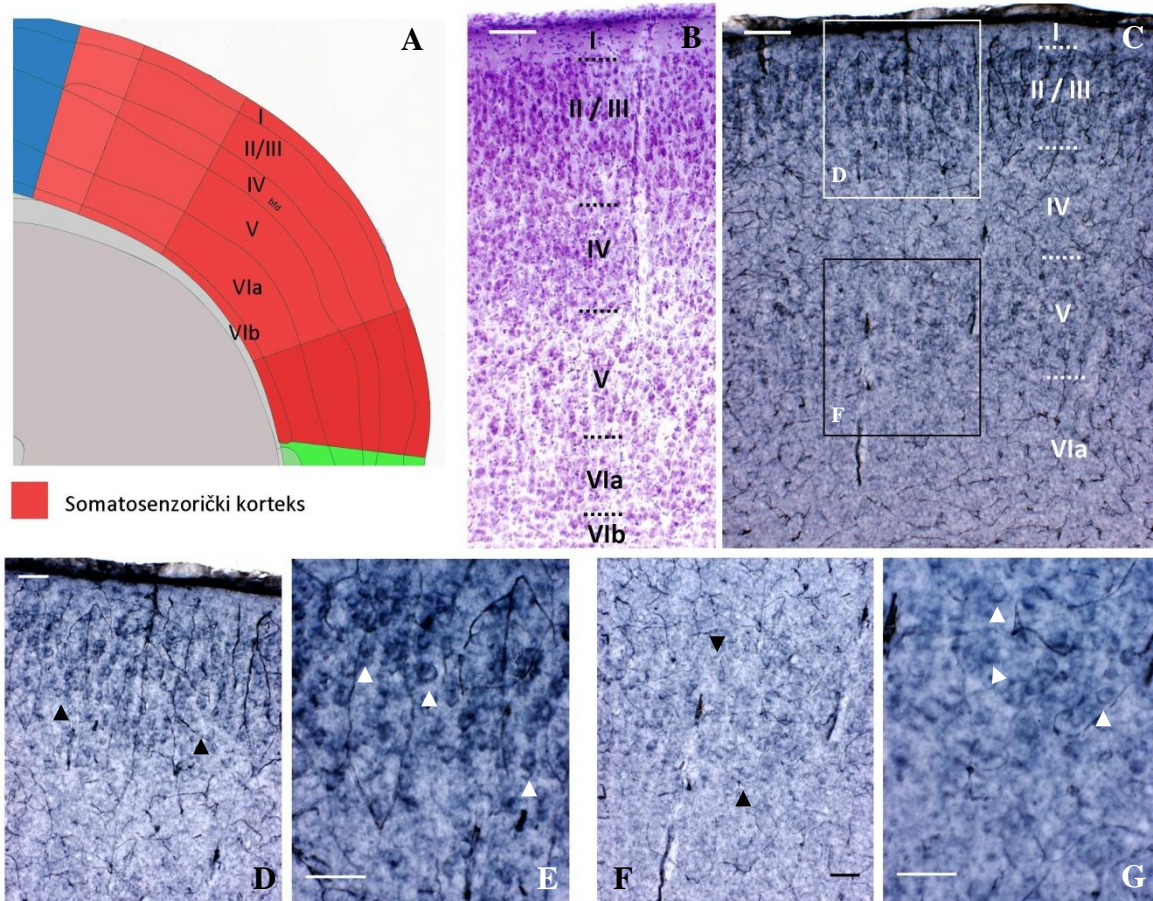


**Slika 11.** Koronarni presjek cerebruma miša starog P15 dana, obojan metodom po Nisslu (A) i imunohistokemijskom metodom za Sema5A (B). Bijele strelice označavaju izražaj Sema5A koji je vidljiv u II./III. sloju motoričkog korteksa, u II./III. i V. sloju somatosenzoričkog korteksa, u II./III. sloju insularnog i 2. sloju piriformnog korteksa. Shematski prikaz organizacije mozga miša (prilagođeno prema Paxinos i Franklin, 2004.) (C). Mjerka = 500  $\mu$ m (A, B)



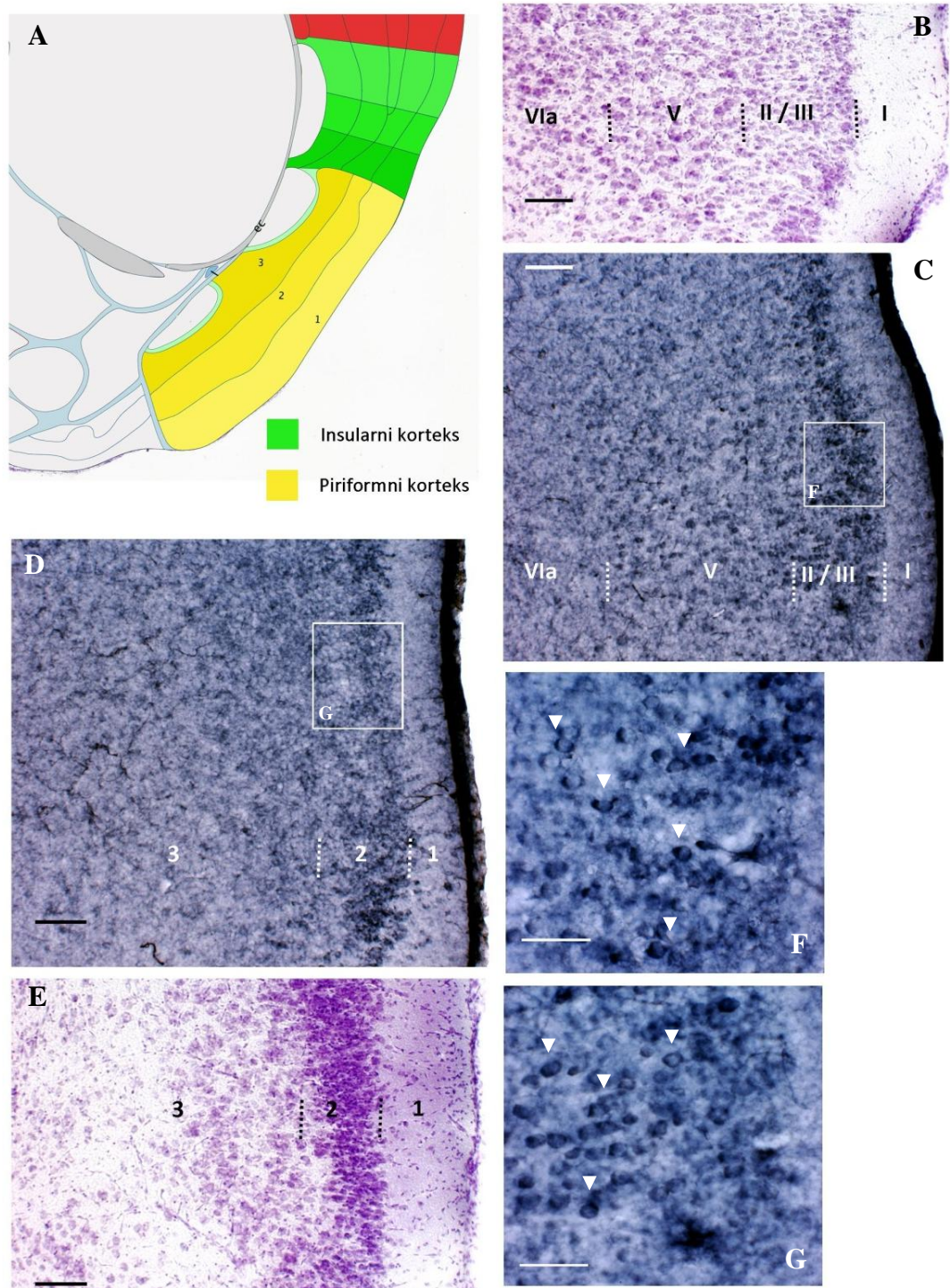


**Slika 12.** Shematski prikaz cingularnog i motoričkog korteksa miša starog P15 dana (prilagođeno prema Allen Institute for Brain Science, 2008.) (A). Prikaz dijela cingularnog korteksa, obojan metodom po Nisslu (B) i imunohistokemijski za Sema5A bez izražaja (C). Prikaz dijela motoričkog korteksa, obojan metodom po Nisslu (D) i imunohistokemijski za Sema5A s izražajem u II./III. sloju (E). Kvadrati pokazuju uvećana područja: cingularnog korteksa bez izražaja (F) i motoričkog korteksa s perisomatskim obojenjem stanica, označenih bijelim strelicama, koje imaju morfologiju neurona (G). Mjerka = 100  $\mu\text{m}$  (B, C, D, E); 50  $\mu\text{m}$  (F, G). Oznake slojeva = I, II/III, V, VIa, VIb.



**Slika 13.** Shematski prikaz somatosenzoričkog korteksa miša starog P15 dana (prilagođeno prema Allen Institute for Brain Science, 2008.) (A). Prikaz dijela somatosenzoričkog korteksa, obojan metodom po Nisslu (B) i imunohistokemijskom metodom za Sema5A s jasnijim izražajem u II./III. sloju i slabijim izražajem u V. sloju (C). Kvadrati pokazuju uvećana područja: II./III. sloja (D), perisomatsko obojenje stanica II./III. sloja, koje imaju morfologiju neurona (E) i V. sloja (F) sa slabije izraženim perisomatskim obojenjem stanica V. sloja, koje imaju morfologiju neurona (G), označeno strelicama. Mjerka = 100  $\mu\text{m}$  (B, C, D, E); 50  $\mu\text{m}$  (F, G). Oznake slojeva = I, II/III, IV, V, VIa, VIb.





**Slika 14.** Shematski prikaz insularnog i piriformnog korteksa miša starog P15 dana (prilagođeno prema Allen Institute for Brain Science, 2008.) (A). Prikaz dijela insularnog korteksa, obojan metodom po Nisslu (B) i imunohistokemijskom metodom za Sema5A s izražajem u II./III. sloju insularnog korteksa (C). Prikaz dijela piriformnog korteksa, obojan metodom po Nisslu (D) i imunohistokemijskom metodom za Sema5A s izražajem u 2. sloju piriformnog korteksa (E). Kvadrati pokazuju uvećana područja: insularnog korteksa (F) i piriformnog korteksa (G) s perisomatskim obojenjem stanica, označenih bijelim strelicama, koje imaju morfologiju neurona. Mjerka = 100  $\mu\text{m}$  (B, C, D, E); 50  $\mu\text{m}$  (F, G). Oznake slojeva: I, II/III, V, VIa, 1, 2, 3.



## 5. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da Sema5A u *in vitro* uvjetima potiče izrastanje i elongaciju embrionalnih neokortikalnih eferentnih aksona miša (Jovanov, 2001.). Utvrdila se njegova bifunkcionalna priroda s privlačnim i inhibitornim efektom na rastuće aksone *fasciculosa retroflexa*, ovisno o tipu sulfatnih proteoglikana prisutnih u razvojnom okolišu. Heparan sulfat proteoglikani moduliraju privlačni efekt, a hondroitin sulfat proteoglikani moduliraju inhibitorni efekt Sema5A na rastući čunjić aksona (Kantor i sur., 2004.). Sema5A regulira povezanost neurona unutar retine (Goldberg, 2004.), a uz Sema5B, inhibira izrastanje aksona retine preko receptora pleksinA1 i pleksinA3 *in vitro* i *in vivo*, ograničavajući ih na unutarnji mrežasti sloj retine (Matsuoka i sur., 2011.). Pokazalo se da nedovoljan izražaj *Sema5A* kod miševa vodi abnormalnom razvoju aksonalne povezanosti u prednjem mozgu i utječe na formiranje funkcionalnih sinapsi (Melin i sur., 2006.), te se smatra da *SEMA5A* ima ulogu u nastanku autizma (Mosca-Boidron i sur., 2016.; Weiss i sur., 2009.). Prostornu i vremensku raspodjelu mRNA semaforina, a među njima i *Sema5A*, u mozgu štakora tijekom embrionalnog razvoja pokazali su Skaliore i sur. (1998.) ukazujući na ulogu semaforina5A u razvoju korteksa i regionalizaciji mozga.

Ovo istraživanje je pokazalo da se prostorni izražaj proteina Sema5A u korteksu miša mijenja tijekom ranog postnatalnog razvoja. Promjena izražaja jasno se uočava u V. i VI.b sloju somatosenzoričkog korteksa. Dok je kod miševa dobi P5 dana izražaj Sema5A jasno vidljiv u slojevima VIb i V somatosenzoričkog korteksa, kod miševa dobi P15 dana izražaj u potpunosti izostaje u VI.b sloju, slabije je izražen u V. sloju, a jasnije izražen u II. sloju korteksa, s vidljivim transmembranskim i perisomatskim obojenjem stanica. Pomak izražaja Sema5A u slojevima somatosenzoričkog korteksa vodi pretpostavci da semaforin5A sudjeluje u postmigracijskoj diferencijaciji neurona u mozgu miša tijekom ranog postnatalnog razdoblja. *In vivo* istraživanja također sugeriraju da Sema5A ima ulogu u radijalnoj migraciji postmitotičkih neurona i pravilnoj kolonizaciji kortikalnih neurona u određene slojeve tijekom razvoja neokorteksa (Chivatakarn, 2008.)

Prostorni i vremenski izražaj proteina Sema5A razlikuje se od izražaja mRNA *Sema5A* u mozgu miša Allen instituta (Allen Institute for Brain Science, 2008.). Izražaj mRNA je puno slabiji dana P4 (Slika 6.) i na sagitalnim rezovima obuhvaća uglavnom rostralni dio V. i VI.b sloja neokorteksa. Četnaestog postnatalnog dana izražaj mRNA duž neokorteksa miša je puno jači u odnosu na P4, i to najviše u slojevima VIa i VIb (Slika7.). Razlike u izražaju mRNA i

proteina pokazane su i za druge gene u razvitku i govore o razvojnom regulatornom potencijalu transkripata koji se ne prepisuju i same translacije kao regulatorni mehanizam ekspresije gena. Također mogućnost postojanja različitih transkripcijskih „slice“ varijanti primarnog transkripata može biti odgovor na razlike u raspodjeli detektiranih signala za mRNA i protein.

Semaforin5A je transmembranski protein, a njegov izražaj potvrđen je transmembranskim i perisomatskim (ekstracelularna domena) obojenjem stanica. Vidljivo transmembransko obojenje same stanica i početaka njihovih izdanaka upućuje na morfologiju neurona. S druge strane, prema Goldbergu (2004.) postoji konstitutivan izražaj *Sema5A* u oligodendrocitima i njihovim prekursorskim stanicama, koji doprinosi vođenju aksona retinalnih ganglijskih stanica tijekom razvoja, a Chivatakarn (2008.) također sugerira da *Sema5A* eksprimiraju oligodendrociti u središnjem živčanom sustavu i Schwanove stanice u perifernom živčanom sustavu. Zaključak o vrsti stanica koje izražavaju transmembranski *Sema5A* zahtijeva dodatna istraživanja koja trebaju uključiti i markere raspoznavanja oligodendroglija stanica ili neurona kao što je NeuN protein, biomarker postmigracijskih neurona (Gusel'nikova i Korzhevskiy, 2015.) ili doublecortin, biomarker migrirajućih, nezrelih neurona (Ayanlaja i sur., 2017.).

Ovo istraživanje također je pokazalo prisutnost *Sema5A* proteina u vidljivom obojenju stijenki krvnih žila na koronarnim rezovima dobi P15 mozga miša što podupire istraživanja koja pokazuju da je izražaj *Sema5A* povezan s razvitkom moždane vaskulature (Chivatakarn, 2008.) te da ima ulogu u poticanju angiogeneze (Purohit i sur., 2014.).

Ovo istraživanje sugerira da transmembranski protein semaforin5A sudjeluje u razvoju neuralne mreže telencefalona temeljem obrasca „inside-out“ vremenske pojavnosti izražaja *Sema5A* najprije u dubljim slojevima korteksa, a kasnije u površnim slojevima i podupire dosadašnja istraživanja koja ukazuju na njegovu važnu ulogu u normalnom razvoju mozga. Potrebna su daljnja proučavanja kako bi dobili još detaljniji uvid o ulozi *Sema5A* u pravilnom razvoju mozga i nastanku bolesti.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Prostorni izražaj proteina semaforina5A se mijenja kroz slojeve neokorteksa, ovisno o diferencijacijskom stupnju neurona tj. razvojnoj dobi. Dana P5 izražaj je vidljiv i prominentan u diferenciranijim tj. nižim slojevima neokorteksa. Ovaj se obrazac diferencijacije posebice vidi u somatosenzoričkom korteksu. Dana P15 je izražaj proteina Sema5A stoga prominentan u višim slojevima neokorteksa s jasnim perisomatskim obojenjem neurona, što upućuje na ulogu Sema5A u diferencijaciji neurona i neurita tijekom ranog postnatalnog razdoblja.
2. Izražaj Sema5A specifičan je za pojedine regije mozga. Izražaj i promjene izražaja su prominentne u somatosenzoričkom korteksu, dok u cingularnom korteksu izražaja Sema5A nema. Raspodjela izražaja sugerira da Sema5A ima ulogu u razvoju somatosenzoričkog korteksa tijekom ranog postnatalnog razdoblja. U ispitivanim razdobljima nismo detektirali njegovu ulogu u razvoju cingularnog korteksa. Razlog tome može biti što se cingularna regija razvija i diferencira ranije te ispitivanim vremenskim točkama nismo zahvatili izražaj Sema5A proteina.
3. Male razlike u prostornom izražaju Sema5A u motoričkom, insularnom i piriformnom korteksu tijekom ranog postnatalnog razvoja upućuju na razlike u vremenu diferencijacije ovih regija tj. na njihovu raniju diferencijaciju u odnosu na somatosenzorički korteks.
4. Postoje razlike tijekom ranog postnatalnog razdoblja u vremenskoj i prostornoj raspodjeli izražaja proteina Sema5A i objavljenih rezultata izražaja mRNA *Sema5A*, što upućuje na različitu ulogu transkripata i proteina semaforina5A ili mogućnost uloge odgođene translacije u regulaciji ekspresije gena.
5. Transmembranski i perisomatski izražaj Sema5A odgovara transmembranskoj prirodi Sema5A. Vidljivi počeci dendrita i oblik same stanice ukazuju na morfologiju neurona. Potrebno je detaljnije istraživanje morfologije i vrste neurona koje izražavaju Sema5A.

## 7. LITERATURA

- Adams RH, Betz H, Püschel AW (1996). A novel class of murine semaphorins with homology to thrombospondin is differentially expressed during early embryogenesis. *Mech Dev* **57**: 33–45.
- Alto LT, Terman JR (2017). Semaphorins and their signaling mechanisms. *Methods Mol Biol* **1493**: 1-25.
- Angevine JB, Sidman RL (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**: 766.
- Artigiani S, Conrotto P, Fazzari P, Gilestro GF, Barberis D, Giordano S, i sur. (2004). Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. *EMBO Rep* **5**: 710–714.
- Auladell C, Pérez-Sust P, Supèr H, Soriano E (2000). The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* **201**: 169–179.
- Ayanlaja AA, Xiong Y, Gao Y, Ji G, Tang C, Abdikani Abdullah Z, i sur. (2017). Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility. *Front Mol Neurosci* **10**: 199.
- Cheng Y, Quinn JF, Weiss LA (2013). An eQTL mapping approach reveals that rare variants in the SEMA5A regulatory network impact autism risk. *Hum Mol Genet* **22**: 2960–2972.
- Chivatakarn O (2008). Semaphorin 5A (Sema5A) functions in neocortical development in vivo. University of Rochester, New York.
- Crandall JE, Caviness VS (1984). Axon strata of the cerebral wall in embryonic mice. *Dev Brain Res* **14**: 185–195.
- Duan Y, Wang SH, Song J, Mironova Y, Ming G li, Kolodkin AL, i sur. (2014). Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. *Elife* **3**: 1–24.
- Gage GJ, Kipke DR, Shain W (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp* **65**: 3564.

- Goffinet AM (1979). An early development defect in the cerebral cortex of the reeler mouse. *Anat Embryol (Berl)* **157**: 205-216.
- Goldberg JL (2004). An Oligodendrocyte Lineage-Specific Semaphorin, Sema5A, Inhibits Axon Growth by Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci* **24**: 4989–4999.
- Goodman C, Kolodkin A, Luo Y, Püschel A, Raper J (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* **97**: 551–2.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* **7**: 42–7.
- Jovanov N (2001). Utjecaj semaforina5a na rast aksona mišjeg neokorteksa in vitro. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Judaš M, Milošević N J, Rašin MR, Heffer-Lauc M, Kostović I (2003). Complex patterns and simple architects: molecular guidance cues for developing axonal pathways in the telencephalon. In *Guidance cues in the developing brain* (pp. 1-32). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Judaš M, Kostović I (1997). *Temelji neuroznanosti*. MD, Zagreb.
- Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, Oster SF, Inatani M, Hansen MJ, i sur. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* **44**: 961–975.
- Matsuoka RL, Chivatakarn O, Badea TC, Samuels IS, Cahill H, Katayama K, i sur. (2011). Class 5 Transmembrane Semaphorins Control Selective Mammalian Retinal Lamination and Function. *Neuron* **71**: 460–473.
- Melin M, Carlsson B, Anckarsater H, Rastam M, Betancur C, Isaksson A, i sur. (2006). Constitutional downregulation of SEMA5A expression in autism. *Neuropsychobiology* **54**: 64–69.
- Molnár Z, Adams R, Goffinet A, Blakemore C (1998). The Role of the First Postmitotic Cortical Cells in the Development of Thalamocortical Innervation in the ReelerMouse. *J Neurosci*, **18**: 5746-5765.

- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* **8**: 427–437.
- Mosca-Boidron AL, Gueneau L, Huguet G, Goldenberg A, Henry C, Gigot N, i sur. (2016). A de novo microdeletion of SEMA5A in a boy with autism spectrum disorder and intellectual disability. *Eur J Hum Genet* **24**: 838–843.
- Okada A, Tomooka Y (2012). Possible roles of Plexin-A4 in positioning of oligodendrocyte precursor cells in developing cerebral cortex. *Neurosci Lett* **516**: 259–264.
- Oster SF (2003). Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development* **130**: 775–784.
- Paxinos G, Franklin K (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second edition. Academic Press, Elsevier.
- Paxinos G, Halliday G, Watson C, Koutcherov Y, Wang H (2007). *Atlas of the Developing Mouse Brain*. First edition. Academic Press, Elsevier.
- Purohit A, Sadanandam A, Myneni P, Singh RK (2014). Semaphorin 5A mediated cellular navigation: Connecting nervous system and cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* **1846**: 485–493.
- Rakic P (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science* **241**: 170-176.
- Ramos-Vara JA, Miller MA (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet Pathol* **51**: 42–87.
- Río J a Del, Martínez A, Auladell C, Soriano E (2000). Developmental history of the subplate and developing white matter in the murine neocortex. Neuronal organization and relationship with the main afferent systems at embryonic and perinatal stages. *Cereb Cortex* **10**: 784–801.
- Ruediger T, Zimmer G, Barchmann S, Castellani V, Bagnard D, Bolz J (2013). Integration of Opposing Semaphorin Guidance Cues in Cortical Axons. *Cereb Cortex* **23**: 604–614.

Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M (1998). Molecular cloning and mapping of human Semaphorin F from the Cri-du-chat candidate interval. *Biochem Biophys Res Commun* **242**: 685–691.

Skaliora I, Singer W, Betz H, Püschel AW (1998). Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci* **10**: 1215–1229.

Smart IH (1984). Histogenesis of the mesocortical area of the mouse telencephalon. *J Anat* **138**: 537.

Tissir F, Goffinet A M (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* **4**: 496.

Weiss L, Arking D, The Gene Discovery Project of John Hopkins the Autism Consortium (2009). A genome-wide linkage and association scan reveal novel loci for autism. *Nature* **461**: 802–808.

Werd HJJM Van De, Rajkowska G, Evers P, Uylings HBM (2010). Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain Struct Funct* **214**: 339–353.

Yazdani U, Terman JR (2006). The semaphorins. *Genome Biol* **7**: 211.

2008 Allen Institute for Brain Science. Allen Developing Mouse Brain Atlas. Available from: <http://developingmouse.brain-map.org/gene/show/20119>

<http://www.learnneurosurgery.com/cerebral-cortex---layers.html>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1501>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9037>

<http://ros wikijan2008.pbworks.com/w/page/14975568/Development%20of%20Nervous%20System>

## 8. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

---

Ime i prezime: Darija Putar  
Datum i mjesto rođenja: 23. veljače 1995., Varaždin

### **Završeno obrazovanje:**

---

rujan 2013. – rujan 2016. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij biologije (Sveučilišna prvostupnica biologije)  
ožujak 2014. Tečaj za učitelje skijanja, II dio specijalnosti (učiteljica skijanja), Skijaško učilište, Sexten, Italija  
ožujak 2013. Tečaj za učitelje skijanja, I dio specijalnosti (pripravnica učitelja skijanja), Skijaško učilište, Sexten, Italija  
rujan 2009. – lipanj 2013. Srednja škola Ivanec, Opća gimnazija  
rujan 2004. – lipanj 2007. Glazbena škola Lepoglava, klavir

### **Projekti:**

---

2017. Noć biologije, Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, PMF  
2016. Noć biologije, Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, PMF  
2015. Istraživačko – edukacijski projekt “Papuk 2015” Udruge studenata biologije - BIUS  
2015. Noć biologije, Biološki odsjek, PMF  
2014. Noć biologije, Biološki odsjek, PMF

### **Radionice:**

---

svibanj 2018. GIMP ili kako besplatno fotošopirati slike (GIMP 2.8), Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računski centar  
svibanj 2018. PowerPointiranje ili kako izraditi moćne prezentacije (PowerPoint 2016)  
rujan 2017. Ljetna škola Horizon 2020-TWINN projekta “MendTheGap”: Integracija genetike i zooarheologije; Vela Luka, Hrvatska

### **Znanja i vještine:**

---

Rad na računalu Korištenje alata Microsoft Office, GIMP- Gnu Image Manipulation Program, Mendeley  
Strani jezici Engleski jezik: C1  
Njemački jezik: B2