

# Razvojni procesi uključeni u gubitak nogu kod zmija

---

Habuš, Gabriela

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:217:320579>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Gabriela Habuš

**Razvojni procesi uključeni u gubitak nogu  
kod zmija**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Gabriela Habuš

**Developmental processes involved in limb  
loss in snakes**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Romane Gračan.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Razvojni procesi uključeni u gubitak nogu kod zmija

Gabriela Habuš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zmije (Serpentes) zajedno s gušterima (Lacertilia) čine ljuskaše (Squamata) i najpoznatija su skupina životinja kod kojih je prisutan gubitak udova. Fosili zmija nemaju razvijene prednje udove, dok su im stražnji udovi u potpunosti razvijeni. Kod većine današnjih zmija je prisutan potpun gubitak udova i samo zmije skupine Booidea i Scolecophidia imaju rudimentarne stražnje udove. Uz gubitak udova vezana je elongacija trupa koju su zmije postigle ubrzanjem somitogeneze i produljenjem ekspresije gena *Oct4*, jednog od regulatora ekspresije Hox gena. Hox geni su visoko konzervirani razvojni geni odgovorni za razvitak pojedinih dijelova tijela. Područja ekspresije Hox gena kod zmija uglavnom nisu promijenjena, ali došlo je do promjena u njihovoj interpretaciji što je rezultiralo promjenom u ekspresiji gena važnih za inicijaciju pupoljaka uda i pridonijelo njihovom gubitku. Također tijekom embrionalnog razvoja udova kod zmija ne dolazi do uspostavljanja dvaju signalnih centara zbog mutacija u pojačivačima odgovornim za njihovo održavanje što je i u konačnici rezultiralo potpunim ili djelomičnim gubitkom udova. Nasuprot tome, zmije su zadržale neke gene za razvoj udova koji su uključeni u razvoj vanjskih dijelova genitalija.

Ključne riječi: regulacija ekspresije gena, signalni centri uda, ZRS, Hox geni, elongacija trupa (32 stranice, 8 slika, 84 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

## Developmental processes involved in limb loss in snakes

Gabriela Habuš

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Snakes (Serpentes) and lizards (Lacertilia) belong to „scaled reptiles“ (order Squamata) and are the most famous clade of animals in which limb loss occurred. Snake fossils do not have forelimbs while their hindlimbs are well developed. Most recent snakes completely lost their limbs and only clades Booidea and Scolecophidia have rudimentary hindlimbs. The loss of limbs is related to the elongation of the trunk which snakes achieved by accelerating somitogenesis and prolonging the expression of the *Oct4* gene, one of the regulators of Hox gene expression. Hox genes are highly conserved regulatory genes responsible for the development of certain parts of the body. Their expression domains are mostly unchanged in snakes, but there are changes in their interpretation resulting in a change in the expression of genes important for limb bud initiation which contributed to limb loss. Also, during embryonic development of limbs in snakes, the establishment of two signaling centers does not occur due to mutations in the enhancers responsible for their maintenance, which ultimately resulted in the complete or partial loss of limbs. In contrast, snakes have preserved some genes that are involved both in development of limbs and external genitalia.

Keywords: gene expression regulation, limb signaling centers, ZRS, Hox genes, trunk elongation

(32 pages, 8 figures, 84 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

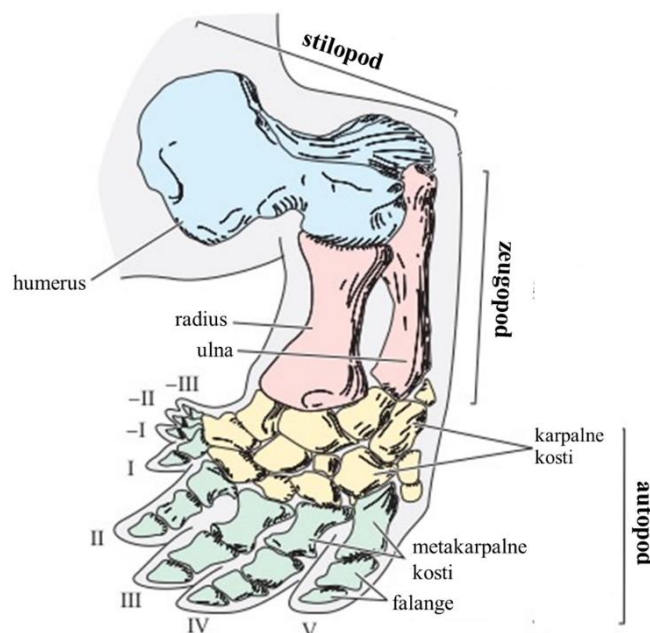
Mentor: Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Aksijalna elongacija .....	6
2.1 Somitogeneza.....	7
2.2 Elongacija trupa .....	9
2.3 Regionalizacija tijela .....	11
3. Razvoj udova kod Tetrapoda.....	13
3.1 Inicijacija razvoja udova kod Tetrapoda .....	13
3.2 Razvoj triju osi u udovima Tetrapoda .....	14
4. Gubitak udova kod zmija .....	16
4.1 Inicijacija udova kod zmija.....	18
4.2 Razvoj triju osi udova kod zmija .....	19
5. Zaključak .....	22
6. Literatura .....	23
7. Životopis.....	32

## 1. Uvod

Zmije su kralježnjaci koji spadaju u nadrazred Tetrapoda. Tetrapoda odlikuju četiri uda s pet prstiju dok su predci ove skupine imali po osam prstiju na svakom udu. Većina životinja iz nadrazreda Tetrapoda žive na kopnu, a manji broj ih je sekundarno prešao u vodu. Ud Tetrapoda (Slika 1.) moguće je podijeliti na tri dijela. Prvi dio, najbliži tijelu, je stilopod kojeg čine humerus u prednjem udu i femur u stražnjem, zatim zeugopod koji u prednjem udu čine ulna i radius dok su u stražnjem tibia i fibula. Zadnji dio koji je najudaljeniji od tijela je autopod kojeg u prednjem udu čine zapešće, pešće i prsti, a u stražnjem gležanj, stopalo i prsti (Pough i sur. 2023).



**Slika 1.** Prednji ud pretka nadrazreda Tetrapoda. Ud je podijeljen na stilopod (humerus), zeugopod (radius i ulna) i autopod (pešće kojeg čine karpalne kosti, zapešće od metakarpalnih kostiju i prsti građeni od falanga). Prsti su označeni rimskim brojevima od –III do V. Današnji Tetrapoda imaju prste od I do V, a izgubili su one od –I do –III. Preuzeto i prilagođeno iz Liem i sur. (2001).

Nadalje, zmije pripadaju razredu Reptilia (gmazovi), a razredi Reptilia i Mammalia (sisavci) zajedno čine Amniota, čija je glavna osobina amniotsko jaje s ovojnicama embrionalnog porijekla (amnion, korion i alantois). Reptilia uključuje dvije skupine, a to su Archosauromorpha (Testudines i Archosauria) i nadred Lepidosauria (Squamata i Rhynchocephalia), a njih čine ektotermalni organizmi koji kao tjelesni pokrov imaju ljuske (iznimka ptice) i za respiraciju koriste pluća (Pough i sur. 2023; Kardong 2018). U nadred Lepidosauria spadaju premosnici (Rhynchocephalia) te gušteri (Lacertilia) i zmije (Serpentes)

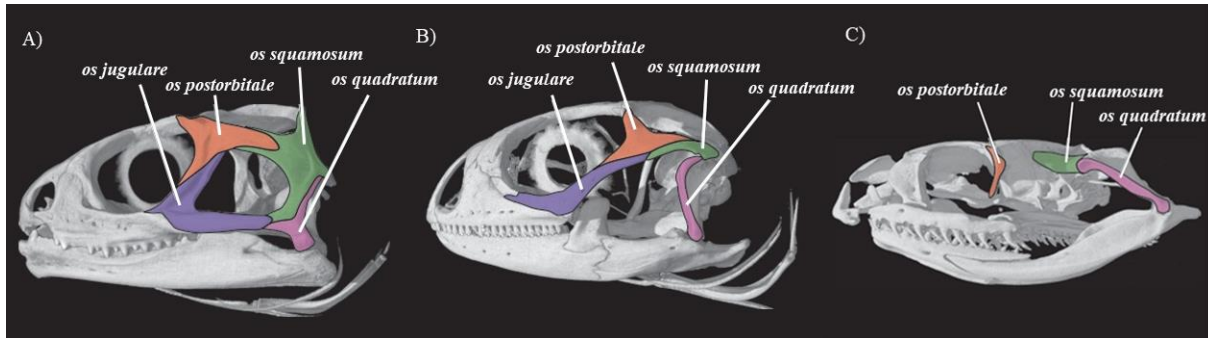


koji zajedno čine Squamata jer su zmije, filogenetski gledano, ugniježdene unutar guštera. Pripadnici Lepidosauria žive gotovo isključivo na kopnu, a može ih se pronaći na svim kontinentima osim Antartike. Neka njihova obilježja su mogućnost odbacivanja repa (iznimka zmije), otvor kloake im je postavljen transversalno dok je u ostalih Tetrapoda longitudinalno i njihovo tijelo ne raste tijekom cijeloga života, već do određene dobi. Nadalje, mužjaci iz reda Squamata imaju bilateralne penise (hemipenisi) za kopulaciju, dok ženke mogu biti oviparne ili viviparne. Zmije imaju samo kromosomsko određivanje spola za razliku od guštera koji uz kromosomsko imaju i okolišno određivanje spola (Pough i sur. 2023).

Zmijoliko tijelo koje odlikuje produženje tijela i redukcija ili gubitak udova (Caldwell 2003) nije isključivo obilježje zmija, već je česta pojava i u drugim skupinama životinja. Takav oblik tijela evoluirao je barem 14 puta u riba (Ward i Brainerd 2007), mnogo puta u vodozemaca (Parra-Olea i Wake 2001), 25 puta u Squamata (Wiens i sur. 2006) i u nekih sisavaca poput kuna (porodica Mustelidae) i kitova (red Cetacea) (Bejder i Hall 2002; Gliwicz 1988). Iz ovih podataka vidljivo je da je ova značajna promjena oblika tijela široko zastupljena među životinjama, a zahvatila je velik broj vrsta unutar Squamata što ih čini dobrim modelom za proučavanje evolucije zmijolikog tijela (Wiens 2009). Elongacija tijela može se postići produživanjem trupa, repa ili oboje (Brandley i sur. 2008) na način da se kralješci produlje ili se poveća njihov broj (Bergmann i Morinaga 2019). Sve skupine sa zmijolikim predstavnicima unutar Squamata, a to su porodice Anguidae, Cordylidae, Dibamidae, Gerrhosauridae, Gymnophthalmidae, Pygopodidae i Scincidae (Wiens i sur. 2006) i podred Serpentes (Brandley i sur. 2008) postigle su produženje tijela dodavanjem kralježaka (Bergmann i Morinaga 2019). Među ovim skupinama, ali i u ostalih životinjama s gubitkom udova, zabilježen je češći gubitak prednjih udova (Royle i sur. 2021).

Gušteri bez nogu koji žive na površini tla imaju izduženo tijelo zbog dugih repova dok im je trup normalne duljine. S druge strane, gušteri koji žive pod zemljom imaju izduženo tijelo zbog produljenja trupa, a rep im je kratak. Zmije imaju oblik tijela poput guštera bez nogu koji žive pod zemljom (Pough i sur. 2023). Nadalje, zmije i gušteri imaju mnogo razlika u morfologiji i ponašanju npr. zmije za razliku od guštera nemaju kapke i ušne otvore, ali ključna je razlika u građi njihove diapsidne lubanje (Slika 2.). Diapsidna lubanja ima dva otvora iza očiju koji se nazivaju fenestrama i omeđeni su gornjom (čine ju *os squamosum* i *os postorbitale*) i donjom (čine ju *os jugulare* i *os quadratum*) temporalnom pregradom. Gušteri imaju gornju temporalnu pregradu i sustav pomičnih kostiju koje su spojene u četiri točke i izgubili su donju temporalnu pregradu, što im omogućava veću mobilnost lubanje od ostalih gmazova, a lijeva i desna strana

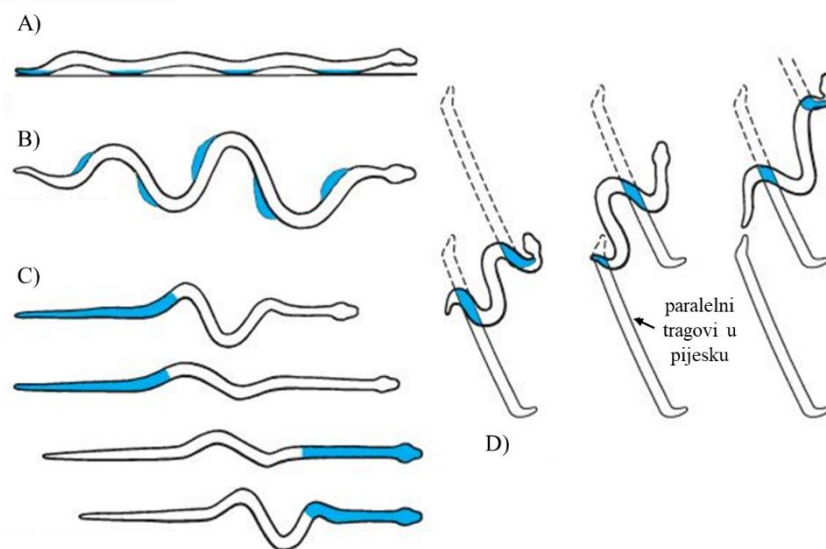
čeljusti povezane su koštanim tkivom. Za razliku od njih, zmije imaju kosti lubanje koje čine sustav pomičnih kostiju povezan u sedam točaka i izgubile su donju i gornju temporalnu pregradu, što im omogućava veću mobilnost lubanje od guštera, a lijeva i desna strana čeljusti povezane su elastičnim vezivom zbog čega mogu neovisno pomicati lijevu od desne strane čeljusti i obratno, što zmijama omogućava da pojedu plijen veći od njihove glave.



**Slika 2.** Na slikama su bojama istaknute kosti lubanje koje tvore gornju i donju temporalnu pregradu. A) Diapsidna lubanja s gornjom i donjom temporalnom pregradom. B) Lubanja guštera nema donju temporalnu pregradu, te je vidljiva redukcija kostiju koje čine temporalne pregrade C) Lubanja zmije nema temporalnih pregrada niti os jugulare, a ostale kosti koje su činile temporalne pregrade značajno su reducirane. Preuzeto i prilagođeno iz Pough i sur. (2023).

Sve zmije danas imaju izduženo tijelo veličine od 10 cm do 10 m, grabežljivci su i većina ih je kompletno izgubila udove dok neke skupine imaju zakrčljale stražnje udove (Kardong 2018). Pitoni i boe imaju ostatke stražnjih udova građenih od reducirane zdjelice, zakrčljalog femura i vanjskog privjeska koji izgleda kao kandža dok Scolecophidia imaju još veću redukciju stražnjih udova i zdjelice (Leal i Cohn 2016; Zaher i sur. 2009). Iako zmije nemaju udove koji bi sudjelovali u kretanju, ipak se mogu kretati na četiri načina, ovisno o veličini tijela i vrsti tla po kojem se zmija kreće. Ta četiri načina su kretanje bočnim savijanjem, pravocrtno kretanje, koncertina kretanje i postrano vijuganje (Slika 3.). Kod bočnog savijanja, tijelo zmije se savija i oslanja na nesavršenosti tla odgurujući se od njih. Nadalje, zmije velike mase se obično kreću pravocrtno, na način da izmjenjuju dijelove tijela koji se podižu od tla i dijelove tijela koji su naslonjeni na tlo u obliku valova te se pomoću kontrakcije mišića, od glave prema repu, kreću naprijed u čemu pomažu grube ventralne ljuske koje zmijama daju oslonac kako bi se mogle odgurnuti od tla. Treći oblik je koncertina kretanje koje se koristi u uskim prolazima tako da se stražnji kraj tijela usidri i zatim se savijanjem tijela u obliku postranih zavoja ostatak tijela stisne uza zid i potom se prednji dio tijela izduži naprijed i usidri, nakon čega se pomakne stražnji dio. Zadnji je oblik kretanja postrano vijuganje pri kojem se glava podigne i pruži prema

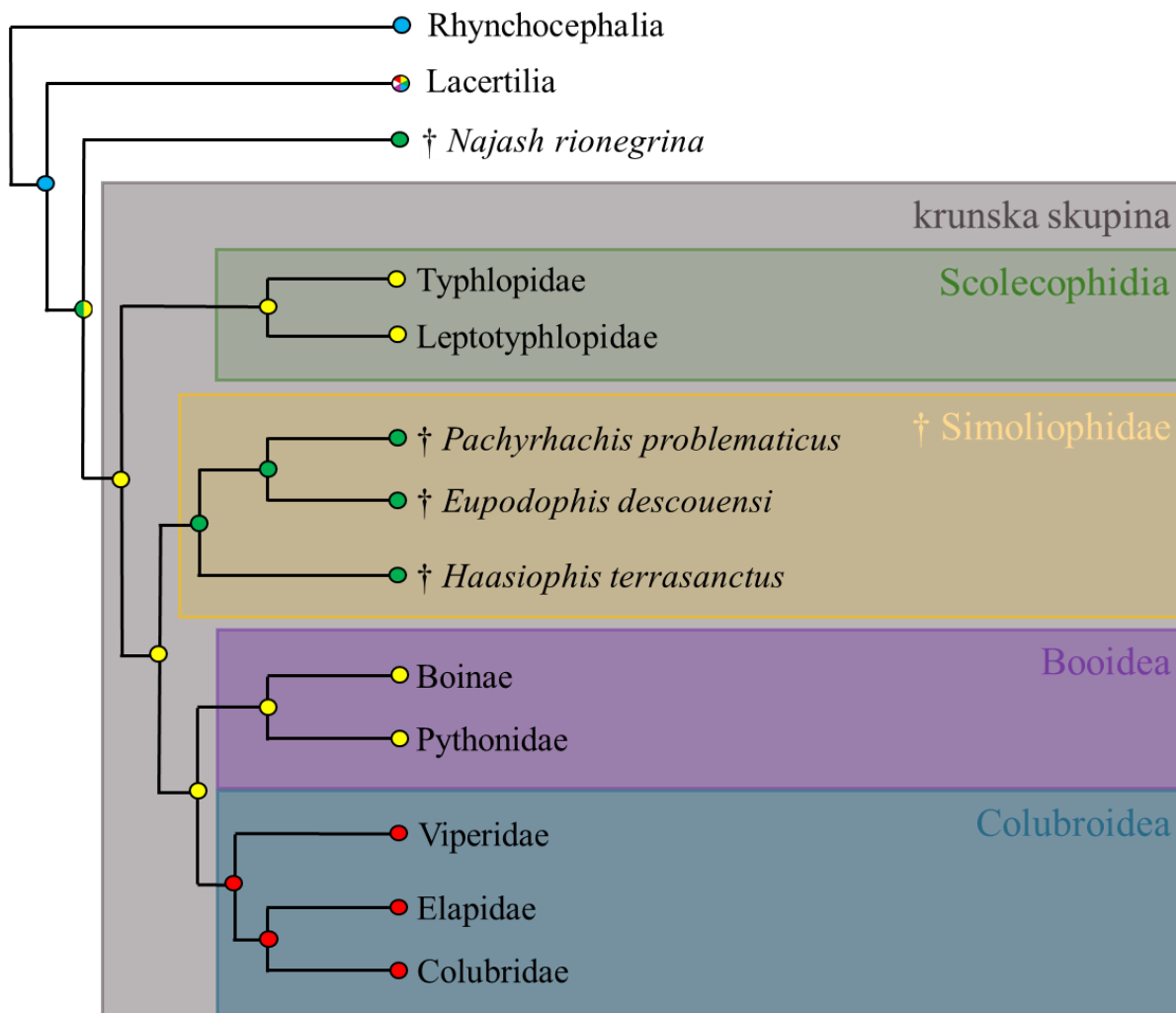
naprijed, a ostatak tijela savija se postrano u odnosu na smjer kretanja pri čemu tijelo dodiruje tlo u dvjema do trima točkama na jednoj strani i prilikom kretanja se izmjenjuje strana tijela koja dodiruje tlo. Postranim vijuganjem se kreću zmijske koje žive u pustinji što im omogućava nedostatak grubih ventralnih ljusaka koje bi povećale trenje pri postranom kretanju (Pough i sur. 2023). Zbog nedostatka udova mišići, rebra i kralješci su ojačani kako bi izdržali mehanički stres zbog savijanja tijela tijekom kretanja (Camaiti i sur. 2021).



**Slika 3.** Četiri načina kretanja zmijske: A) pravocrtno kretanje B) bočno savijanje C) koncertina kretanje D) postrano vijuganje. Plavom bojom su označena mjesta gdje zmijska dodiruje tlo. Preuzeto i prilagođeno iz Encyclopædia Britannica, Inc. (2012).

Prve zmijske pojavile su se početkom krede, prije 128,5 milijuna godina, i potječu iz Laurazije dok se krunska skupina zmijske, kojoj pripadaju sve žive vrste, pojavila prije 108,5 milijuna godina i potječe iz Gondvane. Do velike raznolikosti vrsta zmijske dolazi nakon velikog izumiranja na prijelazu krede u paleogen (Hsiang i sur. 2015), a na slici 4. vidljivi su filogenetski odnosi između pojedinih skupina zmijske. Pretpostavlja se da su zmijske evoluirale iz guštera koji je imao jako reducirane oči, živio pod zemljom i bio prilagođen za kopanje. Razlika u građi očiju guštera i zmijske podržava hipotezu da su se oči zmijske razvile iz reduciranog oblika očiju. Kod zmijske se oko akomodira pomicanjem leće naprijed ili natrag i građa njihovih čunjića odgovara modificiranim štapićima, a kod guštera se akomodacija oka postiže promjenom oblika leće te imaju čunjiće i štapiće različite morfologije (Kardong 2018; Pough i sur. 2023). Od današnjih su zmijske predcima najbližnje porodice Leptotyphlopidae i Typhlopidae koje žive pod zemljom, imaju reducirane oči, ostatke zdjelice i prilagođene su za kopanje (Pough i sur. 2023). U prošlosti su živjele zmijske s dobro razvijenim stražnjim udovima koje nisu bile prijelazni oblici prema gubitku udova, već su bile stabilne vrste kojima je zadržavanje stražnjih udova bila

prilagodba. Velika redukcija stražnjih udova i zdjelice je svojstvo krunske skupine zmija (Garberoglio i sur. 2019). Neke od vrsta s dobro razvijenim stražnjim udovima su izumrla *Najash rionegrina* Apesteguía & Zaher, 2006 koja je živjela na kopnu i sestrinska je skupina svim zmijama te izumrle *Pachyrhachis problematicus* Haas, 1979, *Haasiophis terrasanctus* Tchernov, Rieppel, Zaher, Polcyn & Jacobs, 2000 i *Eupodophis descouensi* Rage & Escuillié, 2000 koje su živjele u moru. S obzirom na položaj ovih triju izumrlih vrsta zmija koje su živjele u moru na filogenetskom stablu, pretpostavlja se da je kod njih došlo do ponovnog razvitka nogu ili je došlo do višestrukog postanka gubitka nogu kod zmija (Zaher i sur. 2009). Po uzoru na objašnjenje ponovnog razvitka očiju u zmija, ponovna pojava udova u ovih vrsta mogla se dogoditi uspješnim razvojem zakrčljalih udova jer su ovim zmijama najbliži srodnici skupina Booidea koja ima zakrčljale udove (Leal i Cohn 2016). Nasuprot tome, kada bi došlo do višestrukog postanka gubitka nogu kod zmija svi fosili bazalnih vrsta zmija od svake skupine (Booidea, Scolecophidia i Colubroidea) morali bi imati udove, ali ti fosili još nisu pronađeni. Prednji udovi su u potpunosti nestali u svim vrstama fosilnih zmija, a nemaju ih niti današnje vrste, što upućuje da su se oni izgubili prije stražnjih udova (Zaher i sur. 2009). Rane zmije poput *Najash rionegrina* Apesteguía & Zaher, 2006 imale su lubanje s obilježjima lubanja zmija i guštera što nam govori da su se prednji udovi izgubili prije nego što su se razvila sva obilježja lubanja zmija (Caldwell i sur. 2015).



**Slika 4.** Filogenetsko stablo zmiya prema rezultatima Hsiang i sur. (2015) dobivenih na temelju fenotipskih obilježja i prema Leal i Cohn (2016) sa označenim fenotipom udova (boja kružića). Vanjske skupine su Lacertilia i Rhynchocephalia, a bazalna skupina je † *Najash rionegrina*. Izumrle skupine označene su sa †. Crvena boja kružića označava potpun gubitak udova, žuta gubitak prednjih udova i zakržljale stražnje udove, zelena gubitak prednjih udova i dobro razvijene stražnje udove, plava dobro razvijene prednje i stražnje udove, ljubičasta dobro razvijene prednje udove i gubitak stražnjih udova, a bijela redukciju prednjih i stražnjih udova. Unutar krunske skupine zmiya (sivi pravokutnik) nalaze se manji pravokutnici koji predstavljaju više taksonomske kategorije i uokviruju niže taksonomske kategorije (listovi filogenetskog stabla) koje im pripadaju.

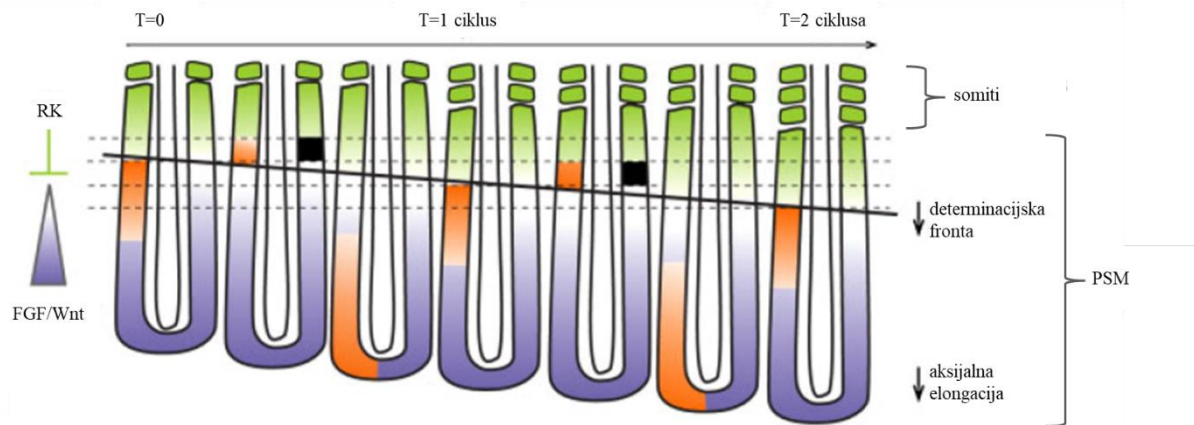
## 2. Aksijalna elongacija

Tijelo kralježnjaka može se podijeliti na glavu, vrat, trup s udovima i rep (Weldon i Münsterberg 2022). Samo je nekoliko skupina unutar Tetrapoda kompletno izgubilo udove i ti slučajevi su

uvijek povezani s elongacijom tijela. Kod zmija je, osim s aksijalnom elongacijom, gubitak udova povezan i s promjenama u regionalizaciji kostura (Leal i Cohn 2018). Značajno produljenje trupa u zmija postignuto je povećanjem broja kralježaka (Bergmann i Morinaga 2019) za što su zaslužne promjene u somitogenezi.

## 2.1 Somitogeneza

Broj somita ovisi o kontroli posteriornog rasta duž aksijalne osi tijela (više jednakih somita što je os dulja) i veličini somita (više manjih somita u osi iste duljine) (Gomez i Pourquie 2009). Somiti nastaju segmentacijom presomitikog mezoderma (PSM) s obje strane neuralne cijevi i iz njih se kasnije razvijaju kralješci, rebra, skeletni mišići stijenke tijela i udova te derma leđa (Brent i Tabin 2002; Christ i sur. 2007). Presomitiski mezoderm je naziv za rani paraksijalni mezoderm. Tijekom gastrulacije stanice epiblasta putuju kroz primitivnu prugu, a kasnije iz pupoljka repa, migriraju u PSM kako se ne bi iscrpio. Nastanak somita ovisi o segmentacijskom satu čije djelovanje ovisi o brzini putovanja determinacijske fronte prema stražnjem dijelu tijela (Slika 5.) koje se odvija zbog elongacije aksijalne osi tijela. Segmentacijski sat čine ciklički geni *Msgn1* i *Mesp2* koji pripadaju Notch, Wnt i FGF signalnim putevima. Ekspresija njihove mRNA ide poput vala od stražnjeg dijela tijela prema prednjem dijelu, a intervali između njihovih ponovnih ekspresija traju koliko je potrebno da nastane jedan somit. Determinacijska fronta mjesto je iza kojeg će doći do segmentacije PSM-a u somit, a određena je anteriornom granicom gradijenta koncentracija proteina FGF8 i WNT3A čiji maksimum se nalazi u pupoljku repa. Anteriorna granica gradijenta FGF8/WNT3A određena je antagonističkim djelovanjem gradijenta retinoične kiseline (RK) koju izlučuju nastali somiti. Stanice u posteriornom PSM-u ostaju u nediferenciranom stanju zbog velike količine ekspresije gena *Fgf8* i *Wnt3a*. Također, u stanicama posteriornog PSM-a započinje ekspresija gena *Msgn1* (Gomez i Pourquie 2009). Kada val ekspresije mRNA od gena *Msgn1* dođe do determinacijske fronte dolazi do smanjenja ekspresije *Msgn1* čime stanice iza determinacijske fronte postanu kompetentne za stvaranje somita (Buchberger i sur. 2000). Zbog smanjenja ekspresije *Msgn1*, iza determinacijske fronte dolazi do inicijacije ekspresije gena *Mesp2* koji određuje posteriornu granicu somita (Morimoto i sur. 2005). Elongacijom aksijalne osi tijela se gradijenti, a s njima i determinacijska fronta pomiču prema stražnjem dijelu tijela jer je ekspresija gena *Fgf8* aktivna samo u pupoljku repa, a kada stanice iz pupoljka repa migriraju u PSM ekspresija *Fgf8* staje (Gomez i Pourquie 2009).



**Slika 5.** Prikazana su dva ciklusa aktivacije gena *Mesp1* i *Mesp2* u PSM-u tijekom somitogeneze. Determinacijska fronta (crna ispunjena linija) određena je granicom antagonističkog djelovanja gradijenta retinoične kiseline (RK) (zeleno) i FGF/Wnt gradijenta (ljubičasto) i pomiče se prema stražnjem dijelu tijela. Narančasto je s lijeve strane prikazan val ekspresije gena *Mesp1* koji kada stigne do determinacijske fronte aktivira gen *Mesp2* (crni kvadrat prikazan na desnoj strani) te segmentacijom na posteriornoj granici (isprekidana linija) nastane somit s obje strane neuralne cijevi (bijela struktura u sredini). Nakon nastanka somita ciklus se ponavlja. Preuzeto i prilagođeno iz Gomez i Pourquie (2009).

Veličina somita određena je udaljenošću koju determinacijska fronta pređe tijekom jedne oscilacije segmentacijskog sata, stoga mijenjanje brzine sata može promijeniti veličinu somita. Broj somita ovisi o vremenu postojanja PSM-a tijekom embriogeneze što je povezano s njegovom veličinom te odnosom između brzine somitogeneze i brzine elongacije aksijalne osi tijela. Ako je somitogeneza brža, PSM brzo nestane i dolazi do zaustavljanja somitogeneze, a ako je elongacija osi brža, onda se PSM dugo održava i somitogeneza se može nastaviti tijekom duljeg vremenskog perioda. Brzina elongacije aksijalne osi ovisi o brzini proliferacije stanica u pupoljku repa i njegovom posteriornom pomicanju. Tijekom somitogeneze kukuruzne zmijske (*Pantherophis guttatus* (Linnaeus, 1766)), pilića (*Gallus domesticus* (Linnaeus, 1758)) i miša (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) veličina PSM-a se prvo povećava, a zatim se kreće smanjivati (Gomez i Pourquie 2009). Somitogeneza se privodi kraju smanjivanjem PSM-a zbog nedostatka signala za proliferaciju stanica iz pupoljka repa (Gomez i sur. 2008) i apoptozom stanica koju kontroliraju faktori iz pupoljka repa i RK iz somita. Smanjivanjem PSM-a RK dolazi bliže pupoljku repa, koji je izvor *Fgf8* i *Wnt3a*, smanjujući ekspresiju ovih gena (Gomez i Pourquie 2009), a do početka smanjivanja PSM-a dolazi kada dođe do inicijacije trup-rep tranzicije zbog čega se smatra da su u regulaciju veličine PSM-a uključeni i Hox geni.

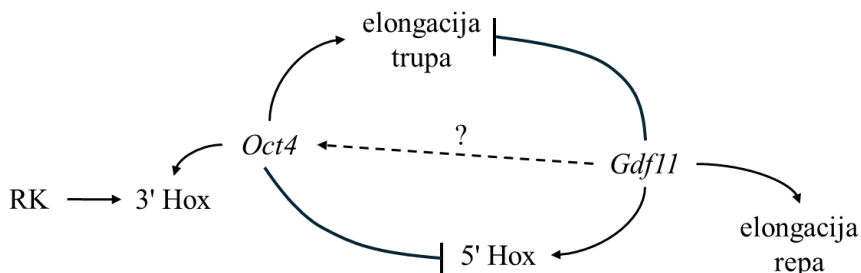


Velik broj malih somita u zmija, iz kojih će nastati kralješci, rezultat je akceleracije segmentacijskog sata u usporedbi s brzinom elongacije aksijalne osi u odnosu na druge životinje iz skupine Amniota, a nije rezultat broja generacija stanica u PSM-u jer kukuruzna zmija ima 315 somita dok je njezin PSM imao 21 generaciju stanica, a miš ima 65 somita dok mu je PSM imao 17 generacija što nije značajna razlika u broju generacija stanica u PSM-u između miša i kukuruzne zmijske (Gomez i sur. 2008).

## 2.2 Elongacija trupa

Gen *Oct4* utišava ekspresiju posteriornih Hox gena, potiče stvaranje trupa i zajedno s RK-a aktivira anteriorne Hox gene (Mallo 2018), dok gen *Gdf11* inducira razvoj repa i aktivaciju posteriornih Hox gena (Slika 6.). Vrijeme i razina ekspresije gena *Oct4* i *Gdf11* određuju duljinu trupa i trenutak inicijacije rasta repa, dok Hox geni određuju identitet regija tijela i djeluju nizvodno od *Oct4* i *Gdf11* (Aires i sur. 2016). Gen *Gdf11* član je porodice gena TGF- $\beta$ , a aktivira se tijekom sredine gastrulacije u posteriornom dijelu tijela te služi kao glavni signal za početak tranzicije trup-rep čime se elongacija trupa završava (Mallo 2018), a aktivira se grupa HoxB gena u pupoljku repa (Gomez i Pourquie 2009). Nasuprot *Gdf11*, gen *Oct4* potiče produženje trupa tako da sprječava širenje ekspresije posteriornih Hox gena prema prednjem kraju tijela (Aires i sur. 2016; Mallo 2018). Provedeni su mnogi eksperimenti na miševima i pokazano je da ukoliko se u mišu promjene ekspresije *Gdf11* ili *Oct4* doći će do promjena u poziciji stražnjih udova gdje će doći do aktivacije posteriornih Hox gena nakon nove inicijacije trup-rep tranzicije (Aires i sur. 2016). U prvom eksperimentu, ukoliko je u mišu odgođena aktivacija *Gdf11*, dolazi do produljenja trupa i pomaka stražnjih udova posteriorno, a prerana aktivacija dovodi do skraćivanja trupa i anteriornog pomaka pozicije stražnjih udova (Jurberg i sur. 2013), dok u drugim eksperimentima, u mišu u kojem nema ekspresije *Oct4* ne dolazi do nastanka trupa, a produljena ekspresija rezultira produljenjem trupa (DeVeale i sur. 2013; Aires i sur. 2016). Iz ovakvih eksperimenata može se pretpostaviti da ekspresija gena *Gdf11* mora nadvladati ekspresiju gena *Oct4* kako bi se zaustavila elongacija trupa i kako bi se zatim prešlo na razvoj repa, ali mehanizam kojim se to postiže nije poznat (Aires i sur. 2016).





**Slika 6.** Mehanizam elongacije trupa i njeno zaustavljanje prelaskom na elongaciju repa. Linija sa strelicom na kraju označava aktivaciju, a linija s okomitom crtom označava represiju. Način djelovanja gena *Gdf11* na gen *Oct4* nije poznat (isprekidana strelica s upitnikom). Prema Aires i sur. (2016) i Mallo (2018).

Produljenje prsnog koša i mezoderma bočne ploče te odgođena aktivacija posteriornih Hox gena karakteristični su za zmijske (Di-Poï i sur. 2010; Woltering 2012; Woltering i sur. 2009) i miševske u kojima je ekspresija *Oct4* vremenski produljena. Ovakvi rezultati potvrđuju da je elongacija trupa zmijske posljedica produženja vremena ekspresije *Oct4* tijekom embrionalnog razvoja zmijske u usporedbi s drugim Amniota. Unutar reda Squamata došlo je do preraspodjele 5' kraja lokusa *Oct4*, što je dovelo do promjene regulatornog okoliša u ovim organizmima. Također, došlo je do različitih promjena u nekodirajućoj sekvenci uz lokus *Oct4* kod guštera i zmijske, s time da je promjena u zmijske konzervirana dok se razlikuje među gušterima. Smatra se da se ta promjena u zmijske dogodila u ključnom mjestu za regulaciju ekspresije gena *Oct4* za razliku od guštera i da je ta promjena uzrok produljene ekspresije *Oct4* u zmijske (Aires i sur. 2016). Razlike u lokusu *Oct4* i nekodirajućoj sekvenci uz njega jedan su od primjera zašto bi se regulatorni okoliš u zmijske i guštera razlikovao od onog u miševske koji se često koriste kao modelni organizmi u istraživanju razvojnih procesa i zbog čega bi se rezultati eksperimenata koji su provedeni na miševske mogli krivo protumačiti u kontekstu evolucije zmijske (Vonk i sur. 2013). U sekvenci gena *Gdf11* došlo je do inverzije kod svih Squamata u usporedbi s ostalim Amniota, ali usprkos inverziji održano je normalno funkcioniranje *Gdf11* u Squamata (Aires i sur. 2016).

Elongaciju aksijalne osi tijela potiču transkripcijski faktori *Cdx*, a zaustavlja ju aktivacija posteriornih Hox gena (paralogni geni *Hox12* i *Hox13*). Aktivacija posteriornih Hox gena događa se zbog utišavanja ekspresije njihovih regulatora *Cdx1* i *Cdx2* (Weldon i Münsterberg 2022) i aktivacije gena *Gdf11* koji promovira ekspresiju posteriornih Hox gena direktno ili moduliranjem količine RK-a preko enzima CYP26A1 koji razgrađuje RK-a (Royle i sur. 2021).

Posteriorni Hox geni izazivaju smanjivanje ekspresije gena Wnt, čime se reducira veličina PSM-a i posljedično dovodi RK-a bliže pupoljku repa uzrokujući daljnje zaustavljanje elongacije aksijalne osi i somitogeneze (Weldon i Münsterberg 2022). U usporedbi s gušterima i ostalim Amniota, kod zmija je nađena normalna ekspresija gena *HoxC13* u području repa, ali izostaje ekspresija gena *HoxA13* i *HoxD13* (Di-Poï i sur. 2010). Nedostatak ekspresije *HoxA13* i *HoxD13* u području repa zmijske pridonosi usporavanju zaustavljanja elongacije osi tijela jer je količina inhibicijskih signala smanjena (Woltering 2012).

### 2.3 Regionalizacija tijela

Hox geni posreduju stvaranje rebara i zaustavljanje elongacije aksijalne osi tijela te određuju identitet kralježaka, to jest paraksijalnog mezoderma prije formacije somita. Radi se o porodici gena koja je u genomu organizirana u 4 skupine (A, B, C i D), a nastali su duplikacijom gena kod predaka zbog čega su geni iz ovih skupina međusobno slični sekvencom i položajem u genomu te su raspoređeni u 13 paralognih grupa (Mallo 2018). Poredak gena u tim grupama odgovara poretku aktivacije njihove ekspresije duž aksijalne osi tijela (Deschamps i Duboule 2017). Ekspresija Hox gena počinje tijekom gastrulacije aktivacijom preko promjena u strukturi kromatina (Weldon i Münsterberg 2022). Hox geni dijele se još na anteriorne/3' Hox gene (*Hox1-Hox9*) i posteriorne/5' Hox gene (*Hox10-Hox13*). Ekspresija 5' Hox gena odvija se kasnije od ekspresije 3' Hox gena koji su aktivni u području bliže prednjem kraju tijela (Iimura i Pourquié 2006). Ovo svojstvo uzrokuje kolinearnu ekspresiju gena uzduž aksijalne osi tijela definirajući specifične kombinacije Hox gena u svakom somitu. Te kombinacije Hox gena uključene su u određivanje identiteta kralježaka (Gomez i Pourquié 2009). Ekspresija Hox gena koji se nalazi više posteriorno dominantna je nad ekspresijom Hox gena koji se nalazi više anteriorno (Duboule i Morata 1994).

Kralježnica u većine kralježnjaka podijeljena je na šest regija, a to su redom okcipitalna, cervikalna, torakalna, lumbalna, sakralna i kaudalna regija (Weldon i Münsterberg 2022). Vratni kralješci razvit će se iz somita u kojem su aktivni Hox4 geni (Horan i sur. 1995), Hox5-Hox9 geni potrebni su za specifikaciju prsnog koša (McIntyre i sur. 2007), pri čemu anteriorna granica ekspresije gena *HoxC6* odgovara anteriornoj granici torakalne regije u mnogih kralježnjaka i u zmija (Weldon i Münsterberg 2022). Identitet lumbalnih i sakralnih kralježaka određuju Hox10 i Hox11 paralozi (Wellik i Capecchi 2003). Na prijelazu cervikalne u torakalnu regiju razvit će se prednji udovi, a na prijelazu lumbalne u sakralnu stražnji udovi (Royle i sur. 2021). Prednji i stražnji udovi povezani su sa ostatkom kostura preko kostiju ramena i zdjelice (Weldon i Münsterberg 2022). Razina ekspresije Hox gena kontrolirana je količinom RK-a koju izlučuju

somiti u prednjem dijelu tijela i razinom ekspresije gena *Fgf8* čiji je maksimum na stražnjem dijelu tijela. Promjene u količini i vremenu ekspresije RK-a tijekom gastrulacije utječu na razinu ekspresije gena *Tbx5* i anteriornih Hox gena te na poziciju prednjih udova, dok je promjena granica ekspresije Hox4 i Hox9 gena odgovorna za posteriorno proširenje područja ekspresije *Tbx5* i promjenu pozicije prednjih udova. Ovi pomaci u ekspresiji gena izazvani su promjenama u regulaciji vremena ekspresije Hox gena jer gen *HoxB4*, koji potiče aktivaciju gena *Tbx5*, ostaje dulje aktivan zbog čega se gen *HoxB9* koji ograničava područje ekspresije *Tbx5* na prednji dio tijela aktivira kasnije. Pomak u poziciji prednjih udova uzrokovan takvom promjenom regulacije Hox gena nije značajan što upućuje na postojanje dodatnih faktora koji sudjeluju u pozicioniranju prednjih udova. Poziciju stražnjih udova određuje vrijeme ekspresije gena *Gdf11* bez kojeg ne dolazi do ekspresije gena *Tbx4* i *Fgf10* zbog čega se *Gdf11* smatra primarnim regulatorom pozicije stražnjih udova umjesto Hox gena (Royle i sur. 2021).

Gmazovi nemaju prave torakalne i lumbalne kralješke, već dorzalne kralješke sa ili bez rebara. Morfologiju kostura zmija obilježava homogenizacija kralježaka i redukcija/nestanak udova, ramena i zdjelice (Woltering 2012). Regionalizacija tijela utemeljena je s Hox genima uzduž aksijalne osi tijela (Dequéant i Pourquié 2008). Za razliku od sisavaca gušteri i zmije nakupili su transpozone u Hox genima (Di-Poi i sur. 2010) što je dovelo do promjene u njihovoj regulaciji (Woltering 2012). U zmija je zadržan sličan uzorak ekspresije Hox gena u paraksijalnom mezodermu trupa kao i kod miša. Usprkos tome ova regionalizacija nije očita u anatomiji kralježaka kod zmija. Somiti iz kojih nastaje homogena regija kralježaka s rebrima su regionalizirani s Hox genima za koje se zna da imaju uloge u oblikovanju kralježaka i potiskivanju razvitka rebra u miša (Woltering i sur. 2009). Identitet kralježaka s rebrima kod miša potiču Hox6 geni, a u supresiju rebra uključeni su Hox10 geni. U zmija geni Hox10 ubrzano evoluiraju i nalaze se u području s rebrima što upućuje na njihov gubitak funkcije u supresiji razvoja rebra (Woltering 2012). Evolucija zmijolikog tijela uključuje drugačiju interpretaciju kombinacije ekspresija Hox gena nizvodno i promjenu njihove cis-regulacije. Zmije nemaju dobro definiranu tranziciju vrat-trup koja je u drugih Squamata određena s položajem prednjih udova s čime se povezuje nedostatak oštih anteriornih granica nekih 3' Hox gena (Woltering i sur. 2009). Postoji nekoliko teorija o načinu gubitka informacije za pozicioniranje prednjih udova, a to su da je do toga došlo zbog promjena u području ekspresije Hox gena u mezodermu bočne ploče (Cohn i Tickle 1999) ili zbog promijenjene interpretacije Hox gena ili promjena u njihovoj sekvenci (Woltering i sur. 2009), npr. gen *HoxA13* ima specifične supstitucije u zmija i beznogih guštera (Kohlsdorf i sur. 2008).

### 3. Razvoj udova kod Tetrapoda

Regulatorne mreže gena utječu na ponašanje stanica, prvenstveno na procese proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze stanica koji pokreću morfogenezu. Iako su osnovni procesi za razvoj udova među kralježnjacima konzervirani ipak postoje razlike u morfogenezi udova unutar jedinke (drugačiji geni uključeni su u razvoj prednjih i stražnjih udova) i među vrstama (razlike u regulaciji gena i vremenu početka njihove ekspresije) što potiče evoluciju udova (Zhu i Tabin 2023). Nakon inicijacije udovi se razvijaju u tri osi, a to su proksimalno-distalna os (od ramena do prstiju), anteriorno-posteriorna os (od prvog do zadnjeg prsta) i dorzalno-ventralna os (od dorzalne strane šake prema dlanu) (Gilbert 2010).

#### 3.1 Inicijacija razvoja udova kod Tetrapoda

Mjesto na tijelu gdje će se ud razviti određeno je trenutkom aktivacije Hox gena duž aksijalne osi organizma tijekom gastrulacije. Ud se razvija iz stanica somatopleure koja je dio mezoderma bočne ploče embrija, a inicijacija pupoljka uda započinje proliferacijom mezenhimskih stanica mezoderma bočne ploče (Weldon i Münsterberg 2022). Prvi korak u inicijaciji pupoljka uda jest tranzicija epitelnih stanica u mezenhimske stanice u području nastanka uda. Aktivacija gena *Fgf10* potiče gubitak epitelnih obilježja stanica, to jest stanice gube strog raspored, polarizaciju te izlaze iz epitela stvarajući nakupinu mezenhimskih stanica. Osim što pokreće tranziciju epitela u mezenhim *Fgf10* aktivira ekspresiju gena *Fgf8* (Slika 7.) u apikalnom ektodermalnom grebenu (AEG-u) (Zhu i Tabin 2023) i ima ulogu u razvoju mozga, pluća, udova i potiče proliferaciju stanica (Sekine i sur. 1999). Upravo zbog ovih uloga, aktivacija gena *Fgf10* u području gdje će nastati udovi ključan je događaj u njihovoj inicijaciji. Uzvodno od *Fgf10* djeluju geni *Tbx5* i *Tbx4* koji spadaju u T-box porodicu gena i sudjeluju u inicijaciji i održavanju rasta uda (Rallis i sur. 2003; Royle i sur. 2021). Područje ekspresije gena *Tbx5* u prednjim udovima preklapa se s ekspresijama paralognih gena *Hox4* i *Hox5* koji aktiviraju *Tbx5*, a područje ekspresije gena *Tbx4* u stražnjim udovima preklapa se s ekspresijama paraloga *Hox8* i *Hox9*. Ekspresija gena *HoxC9* inducira gen *Pitx1* koji je uzvodni aktivator od *Tbx4*, te također ograničava ekspresiju *Tbx5* na prednji dio tijela (Zhu i Tabin 2023). Gen *Tbx4* aktivan je i na drugim mjestima u organizmu kao što su proktodeum, plućni mezenhim i atrij srca (Chapman i sur. 1996). Uzvodno od anteriornih Hox gena, koji sudjeluju u inicijaciji prednjih udova aktivacijom gena *Tbx5*, djeluje RK iz somita koja regulira područje ekspresije anteriornih Hox gena (Royle i sur. 2021) te također direktno aktivira *Tbx5* (Slika 7.) (Zhu i Tabin 2023). Bez RK-a ne dolazi do nastanka pupoljka uda u pilića (Stratford i sur. 1996), a u miša bez sinteze

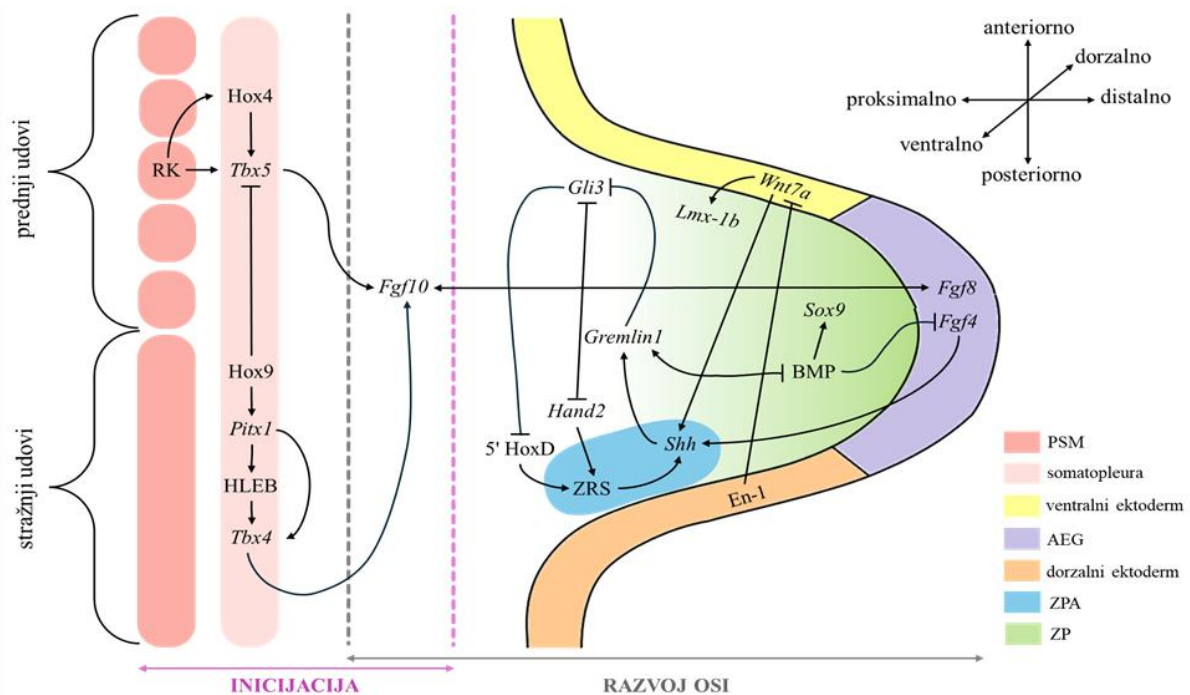
RK-a nema ekspresije gena *Tbx5* i *Fgf10* što za posljedicu ima nedostatak razvoja prednjih udova (Niederreither i sur. 1999). Osim u razvoju prednjih udova, *Tbx5* sudjeluje i u razvoju kostiju ramena (ključne kosti i lopatice), određuje identitet prednjeg uda i bez njega nema indukcije i održavanja AEG-a (Rallis i sur. 2003). Nadalje, na području nastanka stražnjih udova aktivni su geni *Tbx4* i *Pitx1*. Bez ekspresije *Tbx4* dolazi do širenja područja ekspresije gena *Hand2* iz posteriornog dijela uda u anteriorni dio i do inicijacije ekspresije gena *Fgf10*, ali ne i do njezina održavanja (Naiche i Papaioannou 2003). U miša ekspresija gena *Pitx1* odgovorna je za identitet stražnjih udova i aktivaciju ekspresije gena *Tbx4* te indukciju posteriornih *HoxC10* i *HoxC11* gena (Slika 7.) specifičnih za stražnje udove (Logan i Tabin 1999), dok bez ekspresije *Pitx1* dolazi do nastanka skraćenih stražnjih udova s obilježjima prednjih udova (Szeto i sur. 1999). Za aktivaciju gena *Fgf10* u prednjem udu potrebna je ekspresija *Tbx5*, a u stražnjem su potrebni *Tbx4* i koregulator, a za koregulateure su predloženi Wnt geni jer su potrebni da održe ekspresiju *Fgf10* tijekom rasta uda (Royle i sur. 2021).

### 3.2 Razvoj triju osi u udovima Tetrapoda

Uz razvoj proksimalno-distalne osi uda vezan je zadebljali ektoderm na granici dorzalnog i ventralnog ektoderma koji se naziva apikalni ektodermalni greben (AEG) i mezenhimske stanice s mogućnošću proliferacije ispod AEG-a pod nazivom zona progresije (ZP). ZP izlučuje protein FGF10 koji u AEG-u potiče ekspresiju FGF gena od kojih su najvažniji *Fgf8* čija je uloga održavanje proliferacije stanica mezenhima, njihove nediferenciranosti i ekspresije *Fgf10*, te *Fgf4* koji održava ekspresiju gena *Shh* u zoni polarizacijske aktivnosti. Sljedeća je anteriorno-posteriorna os uz čiji je razvoj vezana zona polarizacijske aktivnosti (ZPA) u kojoj je aktivan gen *Shh* (Gilbert 2010). Za aktivaciju ekspresije *Shh* u ZPA-u zaslužna je RK iz somita (Stratford i sur. 1996) i geni koji su aktivni u posteriornom dijelu uda, a to su *Hand2* i 5' *HoxD* geni koji se vežu na ZRS (Slika 7.), a u slučaju proširenja područja ekspresije *Hand2* i 5' *HoxD* gena na anteriorni dio uda dolazi do nastanka druge ZPA-e i duplikacije prstiju (Charité i sur. 2000). ZRS je specifični pojačivač uda koji se nalazi jednu megabazu uzvodno od gena *Shh* u intronu gena *Lmbr1* (Lettice i sur. 2003) i podijeljen je na dvije domene. Prva domena je 5'-domena koja je odgovorna za pravilnu vremensku i prostornu aktivaciju *Shh* promotora dok je 3'-domena važna za postavljanje pravilne strukture kromatina *Shh* promotora i onemogućava aktivaciju ekspresije gena *Shh* u anteriornom dijelu uda (Zhu i Tabin 2023). U određivanju veličine ZPA-e osim ZRS-a sudjeluje i gen *Shh* regulirajući broj stanica u ZPA-u preko BMP2-signala (Bastida i sur. 2009) za apoptozu stanica u posteriornom dijelu ZPA-e (Sanz-Ezquerro i Tickle 2000). Osim toga, ekspresija *Shh* potiče ekspresiju gena *Gremlin1* u

posteriornom dijelu uda. Protein Gremlin1 inhibira ekspresiju gena *BMP4* koji bi inhibirao djelovanje *Fgf4* gena. Osim *BMP4*, protein Gremlin1 ograničava ekspresiju gena *Gli3* na anteriorni dio uda gdje ekspresija *Gli3* inhibira ekspresiju gena *Shh* i drugih gena koji su aktivni u posteriornom dijelu uda kao što su 5' HoxD geni (Slika 7.). Posljednju, dorzalno-ventralnu os karakterizira ekspresija gena *Wnt7a* u dorzalnom ektodermu koji potiče ekspresiju gena *Shh* u ZPA-u i gena *Lmx-1b* u mezenhimu koji određuje identitet dorzalnog dijela uda. Na ventralnoj strani ektoderma aktivan je gen *En-1* koji ograničava ekspresiju *Wnt7a* na dorzalnu stranu, a time i ekspresiju *Lmx-1b* gena (Slika 7.; Carlson 2013). Sve tri osi međusobno djeluju jedna na drugu na sljedeći način: gen *Shh* iz ZPA-e potiče ekspresiju gena *Fgf4* u AEG-u tako da inhibira BMP gene, a *Fgf4* iz AEG-a i gen *Wnt7a* iz dorzalnog ektoderma pozitivno utječu na ekspresiju gena *Shh* u ZPA-u (Gilbert 2010). Segmentacija uda na stilopod, zeugopod i autopod određena je ekspresijom HoxA i HoxD paralognih gena (Mallo 2018) tako da su u stilopodu aktivni Hox9 i Hox10 paralozi, u zeugopodu Hox11 paralozi, a u autopodu Hox12 i Hox13 paralozi (Gilbert 2010). Regulacija dviju faza ekspresije Hox gena tijekom razvoja udova povezana je sa reguliranjem strukture kromatina unutar genoma na mjestima gdje se nalaze Hox skupine (Mallo 2018) pomoću topološki asocijativnih domena (TAD-a) koje predstavljaju regije u genomu u kojima su interakcije između kromatina učestalije nego u drugim dijelovima genoma (Dixon i sur. 2012; Mallo 2018). Tijekom ranog razvoja pupoljka uda aktivna je 3' TAD koja obuhvaća grupe gena od Hox3 do Hox11 te se njezina aktivnost u proksimalnom dijelu uda održava i u kasnijim stadijima razvoja. Kako ud raste, regulatorni okoliš Hox gena u distalnom dijelu uda (autopod) prebaci se s 3' TAD-a na 5' TAD što aktivira paraloge od Hox9 do Hox13. Ekspresija Hox13 paraloga u autopodu ograničava ekspresiju Hox11 paraloga na područje zeugopoda (Mallo 2018). Stanice koje grade ud potječu iz njegova mezenhima. Mezenhim uda čine mezenhimske stanice bočne ploče iz kojih će se razviti kosti, tetive, ligamenti i krvne žile uda, mezenhimske stanice iz somita iz kojih će se izgraditi mišići uda te stanice neuralnog grebena koje će formirati živce i pigmentne stanice uda. Iz somita se luči RK koja potiče diferencijaciju proksimalnog dijela uda dok distalni dijelovi ostaju dulje nediferencirani zbog aktivnih FGF i Wnt gena. Razvoj određenog tipa prstiju ovisi o vremenu izloženosti i koncentraciji proteina SHH u autopodu, a apoptoza mezenhimskih stanica između njih ovisi o ekspresiji BMP gena na tom području (Carlson 2013). Osim apoptoze, BMP geni potiču aktivnost gena *Sox9* (Slika 7.) koji sudjeluje u hondrogenezi na području prstiju i tu inhibira aktivnost BMP i Wnt gena. Aktivnost Wnt gena u tkivu između prstiju inhibira ekspresiju gena *Sox9* koji sudjeluje u hondrogenezi (Raspopovic i sur. 2014). Do završetka razvoja uda dolazi kada se ZPA zbog rasta uda dovoljno udalji od AEG-a da više ne postoji pozitivna povratna

sprega između *Shh* i FGF gena, to jest protein Gremlin1 tada više nije dovoljno blizu kako bi mogao inhibirati ekspresiju gena *BMP4* koji inhibira ekspresiju gena *Fgf4* u AEG-u (Carlson 2013).



**Slika 7.** Inicijacija i razvoj pupoljka prednjeg i stražnjeg uda kod Tetrapoda prema podacima iz Carlson (2013), Roscito i sur. (2022) i Zhu i Tabin (2023). Smjerovi triju osi razvoja uda označeni su u gornjem desnom uglu. Linije koje završavaju strelicom označavaju aktivaciju elementa koji sudjeluje u razvoju, a linije koje završavaju okomitom crtom označavaju inhibiciju elementa. Kratice u legendi označavaju presomitski mezoderm (PSM), apikalni ektodermalni greben (AEG), zonu polarizacijske aktivnosti (ZPA) i zonu progresije (ZP). U kurzivu su napisani geni, a uspravno njihovi pojačivači, nazivi grupa gena i retinoična kiselina (RK).

## 4. Gubitak udova kod zmija

S obzirom na to da veliki broj različitih gena sudjeluje u razvoju udova i da je razvoj sličnih fenotipova zbog promjena u istim genima rijetka pojava, postoji mnogo mogućih evolucijskih puteva kojima je došlo do gubitka udova u različitim skupina (Roscito i sur. 2022). Zahvaljujući sekvenciranju genoma Squamata (Castoe i sur. 2013; Georges i sur. 2015; Song i sur. 2015; Vonk i sur. 2013; Xiong i sur. 2016) moguće je usporediti promjene u genomu, a kasnije i u regulaciji gena između pripadnika određenih skupina što je pridonijelo boljem razumijevanju različitih načina koji stoje iza gubitka nogu promatranih skupina (Infante i sur. 2018). Tako je analiza genoma skupina bez udova pokazala da je došlo do promjena u različitim regulatornim genima između skupina, ali ti promijenjeni geni mogu biti dio istih signalnih puteva. Na primjer,

zmije imaju mutacije u ZRS-u, ali tih mutacija nema u beznogih guštera što upućuje na to da su oni najvjerojatnije izgubili noge promjenama nekih drugih faktora u razvoju udova (Roscito i sur. 2022).

Zmije su vrlo uspješna skupina organizama koja nema udove i sastoji se od 3 400 vrsta (Pincheira-Donoso i sur. 2013). Mnogi geni koji sudjeluju u razvoju udova očuvani su između zmija i životinja s udovima. Nasuprot tomu, geni koji sudjeluju samo u razvoju udova nisu očuvani i imaju mutacije koje su specifične za zmije (Infante i sur. 2015). Konzervirani transkripcijski faktori aktivni su tijekom razvoja hemipenisa i udova kao dio signalnih puteva BMP, FGF i Wnt iako su hemipenisi i udovi značajno različiti morfologijom i funkcijom. Tijekom embriogeneze udovi i hemipenisi nastaju izrastanjem tkiva na prethodno određenim mjestima i imaju regionalne signalne centre koji usmjeravaju rast i daljnji razvoj, ali usprkos ovim sličnostima razvoj udova i hemipenisa nije jednak. Zajednički geni udova i hemipenisa očuvani su jer su bili pod selekcijskim pritiskom bez obzira na gubitak nogu u zmija, a u te gene spada velik broj cis-regulatornih elemenata Hox gena (Infante i sur. 2018). Smatra se da je stražnje udove teže izgubiti zbog povezanosti s razvojem vanjskih dijelova genitalija (Leal i Cohn 2018). Za razliku od njih, geni koji su vezani isključivo uz razvoj udova promijenjeni su ili izgubljeni zbog nedostatka prirodne selekcije za njih jer kako nema udova ti geni su izgubili ulogu u razvoju zbog čega mogu slobodno mutirati. Jedna od mogućih promjena jesu mutacije u veznim mjestima transkripcijskih faktora što za posljedicu ima promjenu regulacije nizvodnih gena (Roscito i sur. 2022) dok bi primjer za gubitak gena bio gen *HoxD12* (Di-Poi i sur. 2010). Zmije su izgubile noge prije 170 milijuna godina (Garberoglio i sur. 2019), a gušteri prije 35-40 milijuna godina (Brandley i sur. 2008) te je zbog ove razlike u vremenu gubitka udova, u zmija nakupljeno više mutacija u sekvencama gena za razvoj udova nego što je u beznogih guštera (Roscito i sur. 2022). Zbog preklapanja u regulaciji razvoja vanjskih dijelova genitalija i udova usporena je evolucija morfologije genitalija u organizama s udovima, ali kod zmija je evolucija vanjskih genitalija ubrzana jer su njihovi regulatori izgubili ulogu u razvoju udova, ali su zadržali ulogu u razvoju genitalija te je tako uklonjen ograničavajući učinak razvoja udova na te regulatore što je dovelo do ubrzanja pojave mutacija u njima (Infante i sur. 2018; Infante i sur. 2015). O evoluciji zmija danas se najviše informacija dobiva proučavanjem živućih vrsta zbog nedostatka fosila (Brandley i sur. 2008) što otežava razumijevanje i objašnjavanje načina na koji je došlo do gubitka nogu u zmija, npr. jesu li se odmah izgubili kompletni udovi ili je prvo došlo do redukcije udova, a onda njihovog gubitka (Camaiti i sur. 2021).

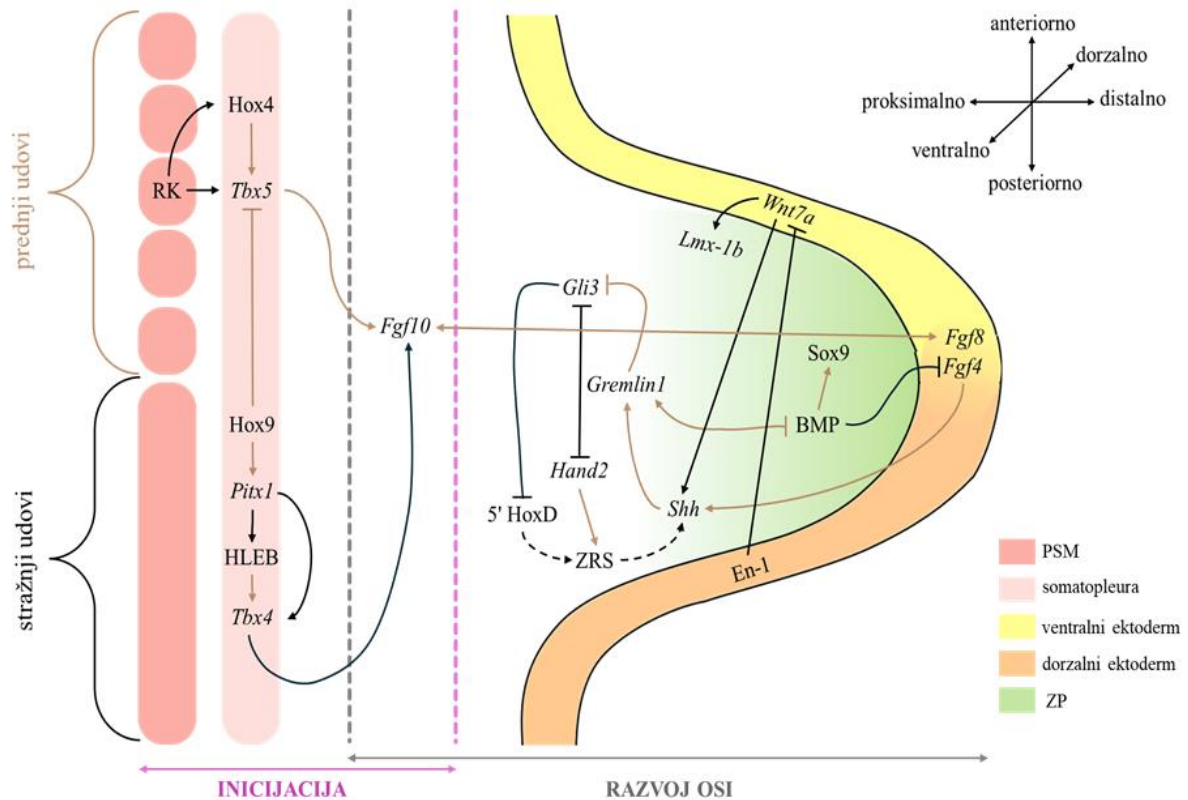


## 4.1 Inicijacija udova kod zmija

Među različitim skupinama organizama s udovima postoje varijacije u inicijaciji pupoljaka udova zbog čega poznati mehanizam inicijacije udova u Amniota ne predstavlja mehanizam razvoja udova svih Tetrapoda (Royle i sur. 2021). S obzirom na razlike u razvoju udova među skupinama i unutar jedinke kod istraživanja gubitka udova u zmija modelni organizmi, umjesto miševa ili pilića, trebale bi biti zmije ili gušteri koji su im najbliži srodnici kako bi se izbjegli mogući lažni rezultati u eksperimentima. Pilići i miševi najčešći su modelni organizmi u istraživanjima gubitka udova u zmija zbog manjeg broja dostupnih sekvenci genoma gmazova i neprilagođenosti znanstvenih metoda za gmazove (Infante i sur. 2018). Danas ipak postoje neke znanstvene metode koje su uspješno prilagođene za gmazove, npr. elektroporacija *in ovo* za macakline i kornjače (Nomura i sur. 2015), transgeneza pomoću lentivirusa za guštere i RNA-interferencija za kornjače (Ge i sur. 2017; Tschopp i sur. 2014).

Zadnji zajednički predak svih zmija imao je sve tri kosti zdjelice (ischium, pubis i ilium) i razvijene stražnje udove, ali nije imao prednje udove i ramena (Palci i sur. 2020). Prema fosilima zmije su potpuno izgubile elemente prednjih udova i ramena te reducirale stražnje udove i zdjelicu prije više od 100 milijuna godina (Houssaye i sur. 2011). Promjene u cis-regulaciji gena *Pitx1* dovele su do redukcije zdjelice u ribe koljuške (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758), lamantina (*Trichechus* Linnaeus, 1758) i miša zbog čega se pretpostavlja da je *Pitx1* zajednička meta među skupinama životinja za redukciju zdjelice. U Squamata i ostalih skupina mehanizam redukcije zdjelice i ramena slabo je istražen (Shapiro i sur. 2006), a mogao bi razjasniti može li doći do gubitka udova zbog redukcije/gubitka zdjelice i ramena ili prvo treba doći do gubitka udova kako bi došlo do redukcije zdjelica i ramena. Gen *Tbx5* regulator je razvoja prednjih udova kojeg aktiviraju Hox4 i Hox5 paralogni geni, zbog čega su promjene u regulaciji Hox gena i nemogućnost odgovora na njih prouzrokovale zastoj razvoja pupoljka uda u zmija (Mallo 2018). Na primjer, kod kukuruzne zmije koja je potpuno izgubila udove pronađena je ekspresija gena *Tbx5* u cijeloj somatopleuri umjesto uobičajene ekspresije *Tbx5* koja je ograničena na područje prednjih udova (Woltering i sur. 2009). Do proširenja područja ekspresije gena *Tbx5* dolazi jer je *Tbx5* izgubio način regulacije pomoću Hox gena (Slika 8.) s obzirom da je njihova ekspresija u zmija kolinearna s onom u ostalih Amniota (Royle i sur. 2021). Kod zelenog anola guštera (*Anolis carolinensis* Voigt, 1832) i miša pojačivač HLEB od gena *Tbx4* koji sudjeluje u razvoju stražnjih udova i vanjskih dijelova genitalija aktivan je u tim područjima, ali kod burmanskog pitona (*Python bivittatus* Kuhl, 1820) i kraljevske kobre (*Ophiophagus hannah* (Cantor, 1836)) nađeno je da je HLEB izgubio ulogu u indukciji

stražnjeg uda (Slika 8.) dok ju je zadržao u genitalijama (Infante i sur. 2015). Mnogobrojni transkripcijski faktori koji su uključeni u razvoj udova i genitalija kod zmija izgubili su ulogu u razvoju udova, ali su je zadržali u razvoju genitalija, u što spadaju i HoxD paralogni geni (Slika 8.; Guerreiro i sur. 2016). Do gubitka uloge ovih transkripcijskih faktora u razvoju uda došlo je zbog promjene njihove regulacije u udovima.



**Slika 8.** Inicijacija i razvoj triju osi pupoljka stražnjeg uda kod pitona prema podacima iz Cohn i Tickle (1999), Guerreiro i sur. (2016), Infante i sur. (2015), Leal i Cohn (2016), Roscito i sur. (2022) i Royle i sur. (2021). Smjerovi osi razvoja pupoljka uda označeni su u gornjem desnom uglu. Linije koje završavaju strelicom označavaju aktivaciju elementa koji sudjeluje u razvoju, a linije koje završavaju okomitom crtom označavaju inhibiciju elementa. Smeđom bojom označene su interakcije koje se ne događaju kod pitona ili nemaju isti rezultat, a crnom bojom označene su interakcije koje se odvijaju kod pitona i kod Tetrapoda. Crne isprekidane linije označavaju interakcije koje se iniciraju u pitona, ali brzo završavaju. Kratice u legendi dolje desno označavaju presomitski mezoderm (PSM) i zonu progresije (ZP). U kurzivu su napisani geni, a uspravno njihovi pojačivači, grupe gena i retinoična kiselina (RK).

## 4.2 Razvoj triju osi udova kod zmija

Ni kod jedne izumrle ili živuće vrste zmija ne dolazi do inicijacije prednjih udova, nemaju kosti ramena (Raynaud 1985), no neke imaju zdjelicu i stražnje udove (Apesteguía i Zaher 2006).

Od živućih zmija rudimentarne stražnje udove koji su izgubili ulogu u kretanju, ali imaju ulogu u parenju (Palci i sur. 2020) imaju zmije koje spadaju u nadporodicu Booidea i slabo istraživani infrared Scolecophidia (Leal i Cohn 2016). Točan mehanizam koji stoji iza gubitka prednjih udova u zmija nije poznat, a njihov rani gubitak otežava proučavanje tih mehanizama. Nasuprot tomu, redukcija stražnjih udova u Booidea i Scolecophidia rezultat je zaustavljanja razvojnog procesa ili kraćeg vremena ekspresije ključnih regulatora za održavanje razvoja udova, dok je nadporodica Colubroidea u potpunosti izgubila stražnje udove i zdjelicu zaustavljanjem inicijacije pupoljaka uda (Zhu i Tabin 2023). Zbog deaktivacije AEG-a i ZPA-e u pupoljku uda nema ekspresije gena *Fgf8* i *Shh*. Postoji inicijacija gena *Shh*, ali njegova se ekspresija ne održi, zbog čega dolazi do zaustavljanja ekspresije gena *Fgf8* u AEG-u i njegovog propadanja (Camaiti i sur. 2021). Promjene u ekspresiji *Shh* i transkripcijskih faktora *Gli3* čije područje ekspresije je prošireno prema proksimalnom dijelu i *Hand2* čija ekspresija se nakon inicijacije smanjuje i nestaje (Slika 8.), doprinose zastoju razvoja udova i njihovom nestanku u zmija (Leal i Cohn 2016). Nadalje, zmije imaju razlike u nekodirajućim sekvencama gena i u sekvencama veznih mjesta transkripcijskih faktora u mnogim regulatornim elementima udova, to jest došlo je do velikih promjena cis-regulatornog okoliša vezanog uz razvoj udova. Neke od tih promjena jesu mutacije u pojačivačima za gen *Gremlin1* koji je antagonist skupine gena BMP koji igraju ulogu u distalnom razvoju udova i prstiju, zatim u pojačivačima za HoxA paralogne gene koji sudjeluju u proksimalno-distalnom razvoju uda, te mutacije u pojačivačima blizu gena *Sox8* i *Sox9* koji su regulatori hondrogeneze i razvoja kostiju (Rosito i sur. 2022). Posteriorni HoxD geni sudjeluju u razvoju prstiju, a kod zmija su ostali konzervirani što se povezuje s njihovom ulogom u razvoju hemipenisa (Leal i Cohn 2016).

Tijekom evolucije zmija, Booidea su se odvojili od Colubroidea prije nego što su stražnji udovi u potpunosti izgubljeni (Head 2015). Embriji pitona započinju formaciju pupoljaka stražnjih udova koji razvijaju hrskavične preteče tibije, fibule i stopala, ali te strukture nisu održive što za posljedicu ima nastanak rudimentarnog femura i terminalne kandže. Ovo otkriće daje temelj za mogući ponovni razvitak stražnjih udova u izumrle porodice Simoliophidae jer nije bio potreban razvoj udova *de novo*, već su se embrionalni udovi mogli održati i razviti u potpuno funkcionalne udove (Leal i Cohn 2016). Hrkavične preteče tibije, fibule i stopala u pitona najvjerojatnije se ne uspijevaju održati zbog promjena u regulaciji BMP gena i ekspresiji Sox gena koji su odgovorni za kontrolu i provođenje hondrogeneze i kasnije kostiju (Slika 8.), te zbog promjene u ekspresiji HoxA gena koji u kasnoj fazi razvoja uda zajedno s HoxD genima usmjeravaju razvoj autopoda, stilopoda i zeugopoda (Rosito i sur. 2022). Pitonov pupoljak uda,

tijekom ranog razvoja ne stvara dvije signalne regije, ZPA i AEG (Slika 8.; Cohn i Tickle 1999). Ekspresija gena *Wnt7a* nalazi se isključivo u dorzalnem ektodermu uda što vrijedi i za druge organizme iz skupine Tetrapoda, stoga *Wnt7a* ne utječe na gubitak udova u pitona (Leal i Cohn 2016). Nadalje, usporedba područja zahvaćenog apoptozom u pupoljcima stražnjih udova burmanskog pitona i zelenog anola guštera pokazala je da je kod pitona došlo do distalnog proširenja područja zahvaćenog apoptozom zbog nedostatka AEG-a (Infante i sur. 2018) što potvrđuje da nedostatak AEG-a može biti mehanizam redukcije udova kako je predložio Rahmani (1974). Zastoju razvoja stražnjih udova pitona pridonose i mutacije koje uništavaju vezna mjesta za transkripcijske faktore u sekvenci ZRS-a koji služi kao regulator ekspresije gena *Shh* u ZPA (Slika 8.). U pupoljku uda dolazi do indukcije ekspresije *Shh* gena, ali ne i do njezinog održavanja (Leal i Cohn 2016). Eksperimentom je pokazano da se ekspresija gena *Shh* u pitonu može održavati ako se transplantira AEG-a iz pilića što znači da mehanizam regulacije ekspresije *Shh* nije kompletno izgubljen u pitona (Cohn i Tickle 1999). Pitoni imaju konzerviranu regiju u sekvenci genoma koja odgovara 3' kraju ZRS-a Tetrapoda s udovima te konzerviranu sekvencu preZRS-a (Park i sur 2008), a na 5' kraju ZRS-a nalaze se tri delecije koje onemogućavaju aktivaciju ZRS-a pomoću trans-djelujućih aktivatora, to jest HOXD9, HOXD10 ili HOXD13 proteina. Ostale mutacije u ZRS-u pitona nalaze se u veznim mjestima za ostale regulatore djelovanja ZRS-a (Kvon i sur. 2016; Leal i Cohn 2016). Kada se ZRS iz kobre ili pitona prebaci u miša ne dolazi do aktivnosti gena nizvodno od ZRS-a (Infante i sur. 2015) jer se okoliš u kojem se nalaze trans-djelujući faktori razlikuje između zmije i sisavaca (Infante i sur. 2018). Ekspresija HoxD paraloga u pitona održava se do kasne faze razvoja uda kada nastane domena koja bi trebala postati autopod (Kvon i sur. 2016; Leal i Cohn 2016).

Colubroidea u koje spadaju npr. kukuruzna zmija i kraljevska kobra kompletno su izgubile noge i kod njih je pronađena još veća degeneracija ZRS-a od 3' kraja prema 5' kraju i preZRS-a dok je kod kukuruzne zmije preZRS izgubljen. Zbog konzervacije 3' kraja ZRS-a u Colubroidea pretpostavlja se da taj dio ZRS-a ima ulogu u razvoju organizama izvan razvoja udova što je ostavljeno za daljnja istraživanja (Leal i Cohn 2016). Pojačivači HoxD gena u pitona također su očuvani, ali u Colubroidea su podlegnuti mutacijama. Istraživanje postojanja razlika u pojačivačima između Booidea i Colubroidea pomogli bi u daljnjem razumijevanju mehanizma iza kompletnog gubitka udova u Colubroidea. Na primjer, trebalo bi se utvrditi dolazi li do nemogućnosti predodređenja područja na kojem bi se trebao razviti ud što bi značilo da se put razvoja udova može odvojiti od razvoja hemipenisa ili je možda uzrok gubitka stražnjih udova

u Colubroidea nedostatak signala koji potiče proliferaciju stanica na predodređenom području za nastanak uda (Leal i Cohn 2018).

## 5. Zaključak

Gubitak udova kod zmija rezultat je složenih evolucijskih procesa, pri čemu su prednji udovi izgubljeni rano, što potvrđuje odsustvo kostiju ramena i prednjih udova kod svih živućih i fosilnih zmija. Nedostatak fosila ranih zmija i neistraženost mehanizama odgovornih za gubitak kostiju i ramena zdjelice značajno otežava razumijevanje ovog fenomena.

Stražnji udovi prisutni su u rudimentarnom obliku kod skupina Booidea i Scolecophidia, dok su u Colubroidea potpuno izgubljeni. Kod nadporodice Booidea u određenom trenutku dolazi do prekida u razvoju stražnjih udova, dok kod nadporodice Colubroidea još nije otkriveno zašto dolazi do potpunog izostanka njihove inicijacije. Razvoj udova regulira kompleksna mreža gena, od kojih su mnogi kod zmija promijenjeni ili izgubljeni, a do promjena je najčešće došlo u nekodirajućim sekvencama koje su povezane uz regulaciju gena. Nasuprot tome, geni povezani s razvojem hemipenisa očuvani su i upravo se ova povezanost smatra razlogom zašto su se stražnji udovi izgubili mnogo kasnije u odnosu na prednje udove.

Iako je ekspresija Hox gena u zmija očuvana, došlo je do promjena u njihovoj regulaciji, pri čemu su neki izgubili ulogu u razvoju udova, ali zadržali funkciju u razvoju drugih struktura. Zmije u pupoljcima uda nemaju signalne centre AEG i ZPA, a mutacije u ZRS regiji smanjile su sposobnost održavanja ekspresije gena *Shh*, ključnog za održavanje razvoja pupoljka uda. Razlike u genima između skupina Colubroidea i Booidea i skupina Booidea i Scolecophidia, koje sudjeluju u razvoju udova, mogu biti predmet daljnjih istraživanja kako bi se razumjele njihove posljedice. Također, trebalo bi provesti istraživanja na većem broju vrsta zmija kako bi se dobila potpunija slika evolucije gubitka udova, a odgovori vezani uz početak evolucije gubitka udova kod zmija mogli bi se potražiti kod beznogih guštera koji su najbliži srodnici zmijama i kasnije su izgubili udove od njih zbog čega su nakupili manji broj mutacija. Općenito, istraživanja vezana za gubitak udova mogu omogućiti bolje razumijevanje procesa odgovornih za embrionalni razvitak pojedinih organskih sustava i otvoriti put u otkrivanju mehanizama ravoja brojnih bolesti.

## 6. Literatura

- Aires, R., Jurberg, A. D., Leal, F., Nóvoa, A., Cohn, M. J., Mallo, M. (2016): Oct4 is a key regulator of vertebrate trunk length diversity. **Developmental Cell** 38(3): 262-274.
- Apesteuguía, S., Zaher, H. (2006): A Cretaceous terrestrial snake with robust hindlimbs and a sacrum. *Nature* 440(7087): 1037-1040.
- Bastida, M. F., Sheth, R., Ros, M. A. (2009): A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development. **Development** 136(22): 3779-3789.
- Bejder, L., Hall, B. K. (2002): Limbs in whales and limblessness in other vertebrates: mechanisms of evolutionary and developmental transformation and loss. **Evolution & development** 4(6): 445-458.
- Bergmann, P. J., Morinaga, G. (2019): The convergent evolution of snake-like forms by divergent evolutionary pathways in squamate reptiles. **Evolution** 73(3): 481-496.
- Brandley, M. C., Huelsenbeck, J. P., Wiens, J. J. (2008): Rates and patterns in the evolution of snake-like body form in squamate reptiles: Evidence for repeated re-evolution of lost digits and long-term persistence of intermediate body forms. **Evolution** 62(8): 2042-2064.
- Brent, A. E., Tabin, C. J. (2002): Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. **Current opinion in genetics & development** 12(5): 548-557.
- Buchberger, A., Bonneick, S., Arnold, H.-H. (2000): Expression of the novel basic-helix-loop-helix transcription factor cMespo in presomitic mesoderm of chicken embryos. **Mechanisms of Development** 97(1-2): 223-226.
- Caldwell, M. W. (2003): “Without a leg to stand on”: on the evolution and development of axial elongation and limblessness in tetrapods. **Canadian Journal of Earth Sciences** 40(4): 573-588.
- Caldwell, M. W., Nydam, R. L., Palci, A., Apesteuguía, S. (2015): The oldest known snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous provide insights on snake evolution. **Nature communications** 6(1): 5996.
- Camaiti, M., Evans, A. R., Hipsley, C. A., Chapple, D. G. (2021): A farewell to arms and legs: a review of limb reduction in squamates. **Biological Reviews** 96(3): 1035-1050.

- Carlson, B. M. (2013): Limb development. U: Carlson B.M. (ur.) Human embryology and developmental biology. Fifth Edition. Kina, Saunders, str. 193-215
- Castoe, T. A., De Koning, A. P. J., Hall, K. T., Card, D. C., Schield, D. R., Fujita, M. K., Ruggiero, R. P., Degner, J. F., Daza, J. M., Gu, W., Reyes-Velasco, J., Shaney, K. J., Castoe, J. M., Fox, S. E., Poole, A. W., Polanco, D., Dobry, J., Vandewege, M. W., Li, Q., Schott, R. K., Kapusta, A., Minx, P., Feschotte, C., Uetz, P., Ray, D. A., Hoffmann, F. G., Bogden, R., Smith, E. N., Chang, B. S. W., Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Richardson, M. K., Mackessy, S. P., Bronikowski, A. M., Yandell, M., Warren, W. C., Secor, S. M., Pollock, D. D. (2013): The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110(51): 20645-20650.
- Chapman, D. L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S. I., Gibson-Brown, J. J., Cebra-Thomas, J., Bollag, R. J., Silver, L.M., Papaioannou, V. E. (1996): Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists** 206(4): 379-390.
- Charité, J., McFadden, D. G., Olson, E. N. (2000): The bHLH transcription factor dHAND controls sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. **Development** 127(11): 2461-2470.
- Christ, B., Huang, R., Scaal, M. (2007): Amniote somite derivatives. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists** 236(9): 2382-2396.
- Cohn, M. J., Tickle, C. (1999): Developmental basis of limblessness and axial patterning in snakes. **Nature** 399(6735): 474-479.
- Dequéant, M. L., Pourquié, O. (2008): Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. **Nature Reviews Genetics** 9(5): 370-382.
- Deschamps, J., Duboule, D. (2017): Embryonic timing, axial stem cells, chromatin dynamics, and the Hox clock. **Genes & development** 31(14): 1406-1416.
- DeVeale, B., Brokhman, I., Mohseni, P., Babak, T., Yoon, C., Lin, A., Onishi, K., Tomilin, A., Pevny, L., Zandstra, P. W., Nagy, A., van der Kooy, D. (2013): Oct4 is required~ E7. 5 for proliferation in the primitive streak. **PLoS genetics** 9(11): e1003957.

- Di-Poï, N., Montoya-Burgos, J. I., Miller, H., Pourquié, O., Milinkovitch, M. C., Duboule, D. (2010): Changes in Hox genes structure and function during the evolution of the squamate body plan. **Nature** 464(7285): 99-103.
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., Ren, B. (2012): Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. **Nature** 485(7398): 376–380.
- Duboule, D., Morata, G. (1994): Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. **Trends in Genetics** 10(10): 358-364.
- Encyclopædia Britannica (2023) 'Snake locomotion'. Dostupno na: <https://kids.britannica.com/students/assembly/view/171904#> (pristupljeno 22. 08. 2024.).
- Garberoglio, F. F., Apesteguía, S., Simões, T. R., Palci, A., Gómez, R. O., Nydam, R. L., E Larsson, H. C., Y Lee, M. S., Caldwell, M. W. (2019): New skulls and skeletons of the Cretaceous legged snake *Najash*, and the evolution of the modern snake body plan. **Science advances** 5(11): eaax5833.
- Ge, C., Ye, J., Zhang, H., Zhang, Y., Sun, W., Sang, Y., Capel, B., Qian, G. (2017): Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. **Development** 144(12): 2222–2233.
- Georges, A., Li, Q., Lian, J., O’Meally, D., Deakin, J., Wang, Z., Zhang, P., Fujita, M., Patel, H. R., Holleley, C. E., Zhou, Y., Zhang, X., Matsubara, K., Waters, P., Graves, J. A. M., Sarre, S. D., Zhang, G. (2015): High-coverage sequencing and annotated assembly of the genome of the Australian dragon lizard *Pogona vitticeps*. **Gigascience** 4(1): s13742-015.
- Gilbert S. F. (2010): Development of the Tetrapod limb. U: Wigg C. (ur.) Developmental biology. Ninth edition. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc., str. 485-510.
- Gliwicz, J. (1988): Sexual dimorphism in small mustelids: body diameter limitation. **Oikos** 53(3): 411-414.



- Gomez, C., Pourquie, O. (2009): Developmental control of segment numbers in vertebrates. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution** 312(6): 533-544.
- Gomez, C., Özbudak, E. M., Wunderlich, J., Baumann, D., Lewis, J., Pourquié, O. (2008): Control of segment number in vertebrate embryos. **Nature** 454(7202): 335-339.
- Guerreiro, I., Gitto, S., Novoa, A., Codourey, J., Hanh, T., Huynh, N., Gonzalez, F., Milinkovitch, M. C., Mallo, M., Duboule, D. (2016): Reorganisation of Hoxd regulatory landscapes during the evolution of a snake-like body plan. **Elife** 5: e16087.
- Head, J. J. (2015): Fossil calibration dates for molecular phylogenetic analysis of snakes 1: Serpentes, Alethinophidia, Booidea, Pythonidae. **Palaeontologia Electronica** 18(1): 1-17.
- Horan, G. S. B., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A., Behringer, R. R. (1995): Compound mutants for the paralogous Hoxa-4, Hoxb-4, and Hoxd-4 genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. **Genes & development** 9(13): 1667-1677.
- Houssaye, A., Xu, F., Helfen, L., De Buffrénil, V., Baumbach, T., Tafforeau, P. (2011): Three-dimensional pelvis and limb anatomy of the Cenomanian hind-limbed snake *Eupodophis descouensi* (Squamata, Ophidia) revealed by synchrotron-radiation computed laminography. **Journal of Vertebrate Paleontology** 31(1): 2-7.
- Hsiang, A. Y., Field, D. J., Webster, T. H., Behlke, A. D. B., Davis, M. B., Racicot, R. A., Gauthier, J. A. (2015): The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. **BMC evolutionary biology** 15(87): 1-22.
- Iimura, T., Pourquié, O. (2006): Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression. **Nature** 442(7102): 568-571.
- Infante, C. R., Rasys, A. M., Menke, D. B. (2018): Appendages and gene regulatory networks: lessons from the limbless. **Genesis** 56(1): e23078.
- Infante, C. R., Mihala, A. G., Park, S., Wang, J. S., Johnson, K. K., Lauderdale, J. D., Menke, D. B. (2015): Shared enhancer activity in the limbs and phallus and functional

- divergence of a limb-genital cis-regulatory element in snakes. **Developmental cell** 35(1): 107-119.
- Jurberg, A. D., Aires, R., Varela-Lasheras, I., Nóvoa, A., Mallo, M. (2013): Switching axial progenitors from producing trunk to tail tissues in vertebrate embryos. **Developmental Cell** 25(5): 451-462.
- Kardong, K. V. (2018): *Vertebrates : comparative anatomy, function, evolution*. Eighth edition. McGraw-Hill Education, New York.
- Kohlsdorf, T., Cummings, M. P., Lynch, V. J., Stopper, G. F., Takahashi, K., Wagner, G. P. (2008): A molecular footprint of limb loss: sequence variation of the autopodial identity gene *Hoxa-13*. **Journal of molecular evolution** 67(6): 581-593.
- Kvon, E. Z., Kamneva, O. K., Melo, U. S., Barozzi, I., Osterwalder, M., Mannion, B. J., Tissières, V., Pickle, C. S., Plajzer-Frick, I., Lee, E. A., Kato, M., Garvin, T. H., Akiyama, J. A., Afzal, V., Lopez-Rios, J., Rubin, E. M., Dickel, D. E., Pennacchio, L. A., Visel, A. (2016): Progressive loss of function in a limb enhancer during snake evolution. **Cell** 167(3): 633-642.
- Leal, F., Cohn, M. J. (2016): Loss and re-emergence of legs in snakes by modular evolution of sonic hedgehog and HOXD enhancers. **Current Biology** 26(21): 2966-2973.
- Leal, F., Cohn, M. J. (2018): Developmental, genetic, and genomic insights into the evolutionary loss of limbs in snakes. **Genesis** 56(1): e23077.
- Lettice, L. A., Heaney, S. J. H., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., de Graaff, E. (2003): A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. **Human molecular genetics** 12(14): 1725-1735.
- Liem K., Bemis W., Walker, W. F., Grande, L. (2001): *Functional anatomy of the vertebrates*. Third edition. Harcourt College Publishers, Fort Worth.
- Logan, M., Tabin, C. J. (1999): Role of *Pitx1* upstream of *Tbx4* in specification of hindlimb identity. **Science** 283(5408): 1736-1739.
- Mallo, M. (2018): Reassessing the role of Hox genes during vertebrate development and evolution. **Trends in Genetics** 34(3): 209-217.

- McIntyre, D. C., Rakshit, S., Yallowitz, A. R., Loken, L., Jeannotte, L., Capecchi, M. R., Willik, D. M. (2007): Hox patterning of the vertebrate rib cage. **Development** 134(16): 2981–2989.
- Morimoto, M., Takahashi, Y., Endo, M., Saga, Y. (2005): The *Mesp2* transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. **Nature** 435(7040): 354–359.
- Naiche, L. A., Papaioannou, V. E. (2003): Loss of *Tbx4* blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. **Development** 130(12): 2681–2693.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., Chambon, P. (1999): Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. **Nature genetics** 21(4): 444–448.
- Nomura, T., Yamashita, W., Gotoh, H., Ono, K. (2015): Genetic manipulation of reptilian embryos: toward an understanding of cortical development and evolution. **Frontiers in neuroscience** 9(9): 45–45.
- Palci, A., Hutchinson, M. N., Caldwell, M. W., Smith, K. T., Lee, M. S. Y. (2020): The homologies and evolutionary reduction of the pelvis and hindlimbs in snakes, with the first report of ossified pelvic vestiges in an anomalepidid (*Liotyphlops beui*). **Zoological Journal of the Linnean Society** 188(2): 630–652.
- Park, K., Kang, J., Subedi, K. P., Ha, J. H., Park, C. (2008): Canine polydactyl mutations with heterogeneous origin in the conserved intronic sequence of *Lmbr1*. **Genetics** 179(4): 2163–2172.
- Parra-Olea, G., Wake, D. B. (2001): Extreme morphological and ecological homoplasy in tropical salamanders. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 98(14): 7888–7891.
- Pincheira-Donoso, D., Bauer, A. M., Meiri, S., Uetz, P. (2013): Global taxonomic diversity of living reptiles. **PloS one** 8(3): e59741.
- Pough, F. H., Bemis, W. E., McGuire, B., Janis, C. M. (2023): Vertebrate life. Eleventh edition. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Rahmanl, T. M. Z. (1974): Morphogenesis of the rudimentary hind-limb of the Glass Snake (*Ophisaurus apodus* Pallas). **Development** 32(2): 431–443.

- Rallis, C., Bruneau, B. G., Del Buono, J., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Nissim, S., Tabin, C. J., Logan, M. P. O. (2003): Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. **Development** 130(12): 2741-2751.
- Raspopovic, J., Marcon, L., Russo, L., Sharpe, J. (2014): Digit patterning is controlled by a Bmp-Sox9-Wnt Turing network modulated by morphogen gradients. **Science** 345(6196): 566-570.
- Raynaud, A. (1985): Development of limbs and embryonic limb reduction. U: Gans, C., Billett, F. (ur.) *Biology of the Reptilia*. Fifteenth edition. New York, Alan R. Liss, Inc., str. 59-148.
- Roscito, J. G., Sameith, K., Kirilenko, B. M., Hecker, N., Winkler, S., Dahl, A., Rodrigues, M. T., Hiller, M. (2022): Convergent and lineage-specific genomic differences in limb regulatory elements in limbless reptile lineages. **Cell reports** 38(3):110280-110280.
- Royle, S. R., Tabin, C. J., Young, J. J. (2021): Limb positioning and initiation: an evolutionary context of pattern and formation. **Developmental Dynamics** 250(9): 1264-1279.
- Sanz-Ezquerro, J. J., Tickle, C. (2000): Autoregulation of Shh expression and Shh induction of cell death suggest a mechanism for modulating polarising activity during chick limb development. **Development** 127(22): 4811-4823.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S. (1999): Fgf10 is essential for limb and lung formation. **Nature genetics** 21(1): 138-141.
- Shapiro, M. D., Bell, M. A., Kingsley, D. M. (2006): Parallel genetic origins of pelvic reduction in vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103(37): 13753-13758.
- Song, B., Cheng, S., Sun, Y., Zhong, X., Jin, J., Guan, R., Murphy, R. W., Che, J., Zhang, Y., Liu, X. (2015): A genome draft of the legless anguid lizard, *Ophisaurus gracilis*. **Gigascience** 4(1): s13742-015.
- Stratford, T., Horton, C., Maden, M. (1996): Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. **Current Biology** 6(9): 1124-1133.
- Szeto, D. P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiberman, A. S., Carlos Izpisua Belmonte, J., Rosenfeld, M. G. (1999): Role of the

- Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. **Genes & development** 13(4): 484-494.
- Tschopp, P., Sherratt, E., Sanger, T. J., Groner, A. C., Aspiras, A. C., Hu, J. K., Pourquié, O., Gros, J., Tabin, C. J. (2014): A relative shift in cloacal location repositions external genitalia in amniote evolution. **Nature** 516(7531): 391-394.
- Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Heimberg, A. M., Jansen, H. J., McCleary, R. J. R., Kerckamp, H. M. E., Vos, R. A., Guerreiro, I., Calvete, J. J., Wüster, W., Woods, A. E., Logan, J. M., Harrison, R. A., Castoe, T. A., De Koning, J., Pollock, D. D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R. B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A. S., Ribeiro, J. M. C., Arntzen, J. W., Van Den Thillart, G. E. E. J. M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R. P., Spaink, H. P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R. M., Richardson, M. K. (2013): The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110(51): 20651-20656.
- Ward, A. B., Brainerd, E. L. (2007): Evolution of axial patterning in elongate fishes. **Biological Journal of the Linnean Society** 90(1): 97-116.
- Weldon, S. A., Münsterberg, A. (2022): Somite development and regionalisation of the vertebral axial skeleton. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 127: 10-16.
- Wellik, D. M., Capecchi, M. R. (2003): Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. **Science** 301(5631): 363-367.
- Wiens, J. J. (2009): Estimating rates and patterns of morphological evolution from phylogenies: lessons in limb lability from Australian *Lerista* lizards. **Journal of Biology** 8(2): 19-19.
- Wiens, J. J., Brandley, M. C., Reeder, T. W. (2006): Why does a trait evolve multiple times within a clade? Repeated evolution of snakelike body form in squamate reptiles. **Evolution** 60(1): 123-141.
- Woltering, J. M. (2012): From lizard to snake; behind the evolution of an extreme body plan. **Current Genomics**. **Current genomics** 13(4): 289-299.
- Woltering, J. M., Vonk, F. J., Müller, H., Bardine, N., Tudeau, I. L., de Bakker, M. A. G., Knöchel, W., Sirbu, I. O., Durston, A. J., Richardson, M. K. (2009): Axial patterning in

- snakes and caecilians: evidence for an alternative interpretation of the Hox code. **Developmental biology** 332(1): 82-89.
- Xiong, Z., Li, F., Li, Q., Zhou, L., Gamble, T., Zheng, J., Kui, L., Li, C., Li, S., Yang, H., Zhang, G. (2016): Draft genome of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. **Gigascience** 5(1): s13742-016.
- Yang, Y., Niswander, L. (1995): Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. **Cell** 80(6): 939-947.
- Zaher, H., Apesteguía, S., Scanferla, C. A. (2009): The anatomy of the upper cretaceous snake *Najash rionegrina* Apesteguía & Zaher, 2006, and the evolution of limblessness in snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society** 156(4): 801-826.
- Zhu, M., Tabin, C. J. (2023): The role of timing in the development and evolution of the limb. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** 11: 1135519.

## 7. Životopis

Gabriela Habuš rođena je 31. svibnja 2002. godine u Zagrebu. Pohađala je program opće gimnazije u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec od 2017. do 2021. godine, a u trećem razredu tijekom 2019./2020. školske godine osvojila je treće mjesto na državnom natjecanju iz biologije. Dobitnica je Rotary club nagrade „dr. Ivan Sklepić“ u Čakovcu 2021. godine. Upisala je prijediplomski sveučilišni studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao član udruge BIUS sudjelovala je na projektu sekcije za biospeleologiju „Podzemlje Učke i Ćićarije 2023.“ i projektu sekcije za šišmiše „Noćni letači Tounja 2024.“. Tijekom akademske godine 2023./2024. u zimskom semestru odrađuje praksu kao izborni kolegij na Biološkom odsjeku pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Brigić u sklopu projekta „Prostorno-vremenska varijabilnost kopnenih i vodenih zajednica povremenih tekućica dinarskog krša (DinDRY)“ kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ). Također, djeluje kao volonter tijekom projekta popularizacije znanosti „Dan i noć PMF-a“ 2024 godine.