

Ekspresija i kolokalizacija razvojnog markera Nkx2.1 s proteinima parvalbumin i nNOS u subtalamičkoj jezgri miša i štakora

Medenica, Tila

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:732803>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tila Medenica

Ekspresija i kolokalizacija razvojnog markera Nkx2.1 s proteinima
parvalbumin i nNOS u subtalamičkoj jezgri miša i štakora

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za razvojnu molekularnu neurobiologiju na Odsjeku za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Gorana Sedmaka i su-vodstvom doc. dr. sc. Sofie Ane Blažević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvale

Želim zahvaliti svom mentoru što sam dobila priliku svoj diplomski rad izraditi u Laboratoriju za razvojnu molekularnu neurobiologiju, na svojoj pomoći, savjetima i vremenu utrošenom na mikroskopiranje i skeniranje mojih preparata. Hvala i su-voditeljici Sofiji na svim savjetima i pomoći pri pisanju ovog rada. Hvala svim tehničarkama na pomoći i na strpljivom odgovaranju na sva moja pitanja. Hvala Sari i Dinku što su me trpili u sobi, i hvala svim ostalim ljudima iz prizemlja što su tolerirali moju prisutnost godinu dana. Hvala i Mihaeli za pomoć pri mikroskopiranju, a najviše hvala Emi, za sve.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na psihološkoj i emocionalnoj podršci tijekom svih godina mog studiranja.

Ovaj rad posvećen je mojoj baki koja mi svakim danom svog oporavka od moždanog udara uživo demonstrira fantastičnu plastičnost mozga, a ponešto me uči i o upornosti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija i kolokalizacija razvojnog markera Nkx2.1 s proteinima parvalbumin i nNOS u subtalamičkoj jezgri miša i štakora

Tila Medenica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Subtalamička jezgra (STh) je struktura diencefalona koja funkcionalno pripada bazalnim ganglijima, a klinički je važna u liječenju Parkinsonove bolesti kao mjesto dubokomozgovne stimulacije. Untoč tome, podaci o sastavu podtipova neurona STh, njihovom molekularnom profilu, te razvojnem porijeklu nedostaju. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati prostornu ekspresiju razvojnog markera Nkx2.1 u STh odraslog mozga miša i štakora te njegovu kolokalizaciju s proteinima parvalbumin i nNOS kako bi se utvrdio molekularni profil neurona STh te kako bi se utvrdile potencijalne evolucijske razlike u razvoju STh između dvije vrste. Korišteni su uzorci mozga miša i štakora muških jedinki starosti 3,5 mjeseci. Ekspresija proteina u STh analizirana je pomoću DAB imunohistokemije, a kolokalizacija proteina u pojedinačnim neuronima analizirana je imunohistokemijskom metodom dvostrukog obilježavanja s fluorescentnim protutijelima. Utvrđeni su obrasci ekspresije navedenih proteina u STh odraslog miša i štakora, no zbog nespecifičnosti sekundarnih protutijela nije utvrđena njihova kolokalizacija. U ovom je istraživanju uočena razlika u ekspresiji markera Nkx2.1 između miša i štakora, što do sada nije opisano u literaturi. Mogući razlozi za ovakve rezultate su da se s dobi smanjuje translacija proteina Nkx2.1, ili da je miš tijekom evolucije izgubio neurone koji ekspimiraju Nkx2.1. Za razrješenje ovih dvojbi potrebno je provesti dodatna istraživanja.

(53 stranice, 25 slika, 3 tablice, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: bazalni gangliji, imunohistokemija, diencefalon

Voditelj: doc. dr. sc. Goran Sedmak

Su-voditelj: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenjivači: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

doc. dr. sc. Rosa Karlić

izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Rad prihvaćen: 19. veljače 2020. godine.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Expression and colocalization of developmental marker Nkx2.1 and proteins parvalbumin and nNOS in the mouse and rat subthalamic nucleus

Tila Medenica

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Subthalamic nucleus (STh) is a diencephalic basal ganglia structure, clinically important as a target in the treatment for Parkinson's disease. Data describing its neuronal composition, molecular profile and developmental origin is still missing. The aim of this research was to analyze spatial expression of the developmental marker Nkx2.1 in the adult mouse and rat STh and colocalization of Nkx2.1 with proteins parvalbumin and nNOS. Another aim was to determine the potential evolutionary difference in STh development between the two species. Brain samples were obtained from male mouse and rat individuals aged 3,5 months. Protein expression was analyzed using DAB immunohistochemistry, and protein colocalization was analyzed using immunofluorescence with double-labeling. Expression patterns of these proteins were obtained, but their colocalization remains unknown due to the unspecificity of secondary antibodies used in the experiment. Difference in the expression of Nkx2.1 between mouse and rat was noticed, which has not yet been described in literature. Possible cause of this result could be the age-dependent downregulation of the protein translation, or that the mouse has lost Nkx2.1-expressing neuron population in the STh during evolutionary time. For definite conclusions further experiments need to be done.

(53 pages, 25 figures, 3 tables, 61 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: basal ganglia, diencephalon, immunohistochemistry

Supervisor: Asst. Prof. Goran Sedmak, PhD

Co-supervisor: Asst. Prof. Sofia Ana Blažević, PhD

Reviewers: Asst. Prof. Sofia Ana Blažević, PhD

Asst. Prof. Rosa Karlić, PhD

Assoc. Prof. Damjan Franjević, PhD

Thesis accepted: 19th of February, 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Evolucija i organizacija bazalnih ganglija	1
1.2. Funkcija subtalamičke jezgre	5
1.3. Struktura subtalamičke jezgre	8
1.4. Citokemija subtalamičke jezgre	10
1.5. Razvoj subtalamičke jezgre	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Životinje	15
3.2. Fiksacija tkiva transkardijalnom perfuzijom	15
3.3. Rezanje tkiva	15
3.4. Bojanje tkiva Nisslovom metodom	16
3.5. Određivanje položaja subtalamičke jezgre na uzorcima	16
3.6. Imunohistokemija – metoda avidin-biotin kompleks (ABC)	19
3.7. Imunofluorescencija s dvostrukim obilježavanjem	21
3.8. Mikroskopija	22
3.9. Obrada slika	22
3.10. Bioinformatička analiza	22
4. REZULTATI	24
4.1. Rezultati dobiveni na tkivu miša	24
4.2. Rezultati dobiveni na tkivu štakora	30
4.3. Rezultati analize sekvenci miša i štakora za gen Nkx2.1.....	40
5. RASPRAVA	43
6. ZAKLJUČAK	47
7. LITERATURA	48
8. PRILOZI	53
9. ŽIVOTOPIS	

POPIS KRATICA:

ABC metoda	avidin – biotin kompleks metoda
BSA	goveđi serumski albumin
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
cp	<i>pedunculus cerebri</i>
CPG	eng. <i>central pattern generator</i>
DAB	3,3' - diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenillindol
DBS	duboka mozgovna stimulacija
DLR	eng. <i>diencephalic locomotor region</i>
GABA	gama-aminomaslačna kiselina
GAD	glutamat dekarboksilaza
Glut	glutamat
GPe	<i>globus pallidus pars externa</i>
GPI	<i>globus pallidus pars interna</i>
ic	<i>capsula interna</i>
E	embrionalni dan
Enk	enkefalin
LH	lateralni hipotalamus
MGE	eng. <i>medial ganglionic eminence</i>
MLR	eng. <i>mesencephalic locomotor region</i>
nNOS	eng. <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NO	dušični oksid
PBS	fosfatni pufer
PFA	paraformaldehid
RNA	ribonukleinska kiselina
RT	sobna temperatura
Rt	retikularna jezgra talamusa
SNC	<i>substantia nigra pars compacta</i>
SNr	<i>substantia nigra pars reticulata</i>
SP	eng. <i>substance P</i>
STh	<i>nucleus subthalamicus</i>
UTR	eng. <i>untranslated region</i>
VGAT	vezikularni GABA transporter
ZI	<i>zona incerta</i>

1. UVOD

Subtalamička jezgra (*nucleus subthalamicus* odnosno *corpus Luysii* ili *discus lentiformis*) jest, kako joj ime nalaže, subkortikalna nakupina sive tvari u obliku lećastog diska. Histogenetski, kao dio subtalamura, pripada međumozgu (*diencephalonu*). Funkcionalno, kao dio ekstrapiramidnog motoričkog sustava, pripada bazalnim ganglijima zbog čega sve više dobiva na važnosti kao klinički značajna struktura u kontekstu liječenja motoričkih poremećaja kao što je Parkinsonova bolest.

1.1. Evolucija i organizacija bazalnih ganglija

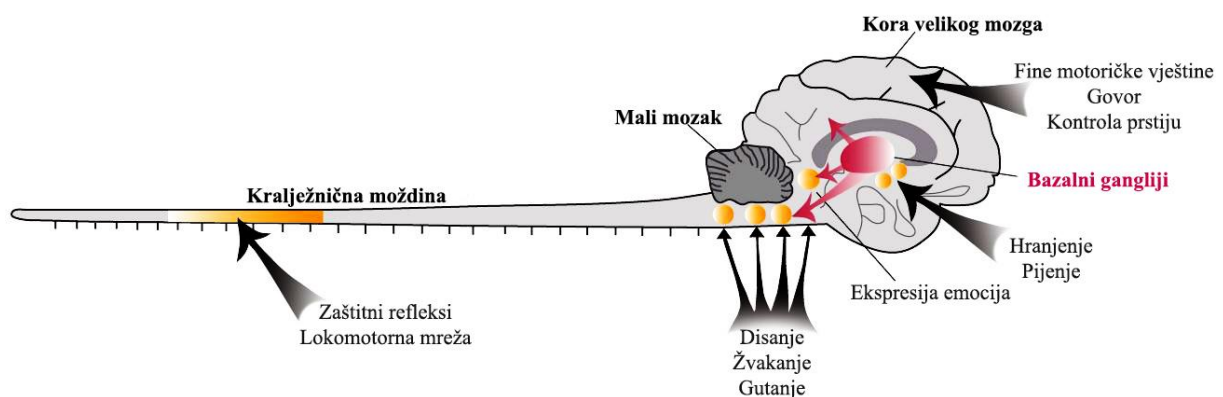
Termin „bazalni gangliji“ odnosi se na skupinu subkortikalnih jezgara u mozgu kralježnjaka i funkcionalno obuhvaća sljedeće strukture: *nucleus caudatus* i *putamen* (skraćeno: *striatum*), *globus pallidus* (GP) koji se sastoji od dva dijela, *pars interna* (GPi) i *pars externa* (GPe), zatim *nucleus subthalamicus* (STN) te *substantia nigra* (SN), koja se također sastoji od dva dijela, *pars compacta* (SNc) i *pars reticulata* (SNr). Te strukture zajedno čine sustav koji je važan za odabir ponašanja, motoričko učenje te za donošenje odluka temeljenih na njihovom vrednovanju (Grillner i sur. 2013).

Svaka vrsta kralježnjaka ima svoj set urođenih obrazaca ponašanja koji se ispoljavaju kroz osnovni repertoar pokreta, kao što su sposobnost organizma da se kreće, da diše i guta, da pokreće svoje oči, da bježi ili da se bori (eng. *fight or flight behaviour*). Motorički programi koji omogućavaju te obrasce ponašanja generiraju se u moždanom deblu i kralježničkoj moždini, a bazalni gangliji imaju glavnu ulogu u odlučivanju kada će se i kako koji program upotrijebiti - odnosno u kontroli pokreta (Grillner i sur. 2013).

Struktura i funkcija bazalnih ganglija očuvana je tijekom evolucije kralježnjaka u zadnjih 560 milijuna godina, što označava vremenski period kada se razred kružnousta (*Cyclostomata*) odvojio od evolucijske linije potkoljena kralježnjaka (*Vertebrata*) unutar koljena svitkovaca (*Chordata*) (Grillner i Robertson 2016). Pored toga, bazalni gangliji pokazuju veliku homologiju u funkciji, živčanoj organizaciji i ekspresiji gena sa sustavom mozga člankonožaca koji se naziva centralni kompleks (eng. *arthropod central complex*), što upućuje na zajedničko porijeklo bazalnih ganglija i centralnog kompleksa (Strausfeld i Hirth 2013). Pretpostavlja se da je zajednički predak, u kojega se prvi put razvio sustav sličan bazalnim ganglijima, pojavio s pojavom bilateralnih životinja (*Bilateria*) te da je najizglednije bio kolutićavac koji je odlučivao kada i kako će se kretati, gdje će tražiti hranu (eng. *foraging*) i

slično, što je zahtijevalo posjedovanje živčane mašinerije koja bi omogućavala takvo ponašanje (Grillner i Robertson 2016).

Osnovna organizacija motoričke infrastrukture u kralješnjaka sastoji se od neuronskih mreža koje se nazivaju središnji generatori uzoraka (eng. *central pattern generators*, CPGs) a kontroliraju ritmičke motoričke pokrete kao što su žvakanje, disanje, gutanje i pokreti očiju (CPG-ovi u moždanom deblu) te lokomocija (CPG-ovi u u kralježničnoj moždini) (Slika 1). Bazalni gangliji igraju glavnu ulogu u odabiru motoričkih ponašanja na način da drže pod inhibicijskom kontrolom te motoričke centre tijekom mirovanja, a puštaju ih da rade samo kad je to potrebno (Grillner i sur. 2013).

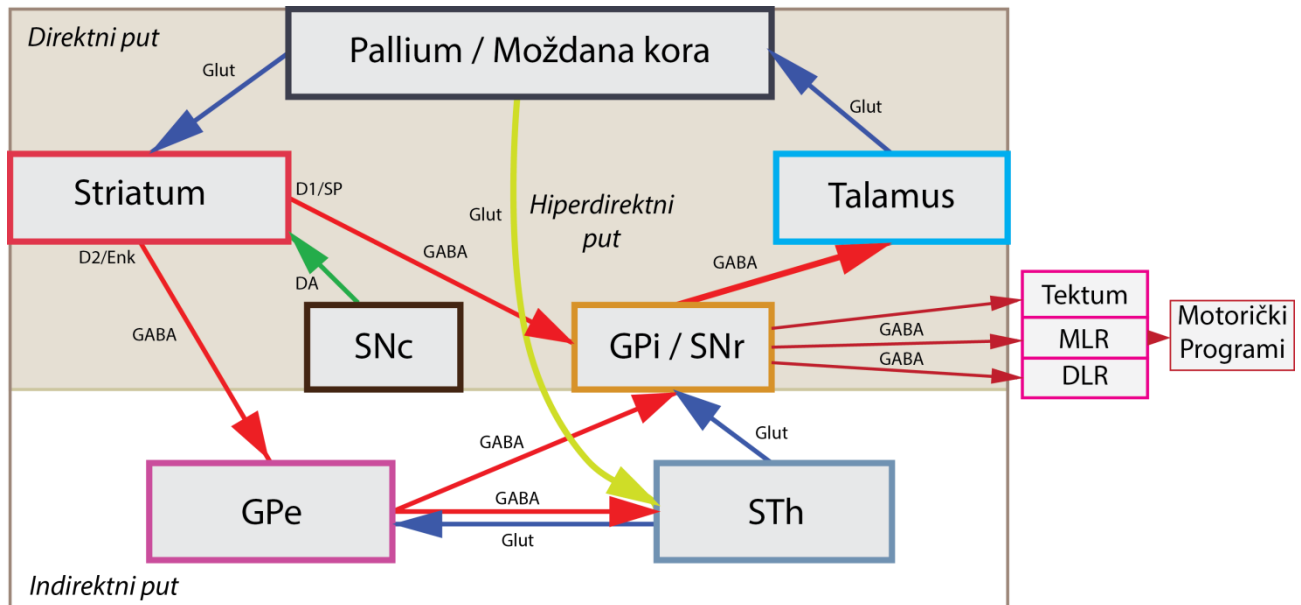


Slika 1. Osnovna organizacija motoričke infrastrukture u kralješnjaka (prilagođeno prema Grillner i sur. 2013).

Izlazni put bazalnih ganglija predstavljaju SNr i GPi, GABA-ergičke jezgre čiji se aksoni projiciraju u gornje kolikule tektuma (*colliculus superior*), u lokomotorne komandne regije mezencefalona i diencefalona (eng. *locomotor command regions*, MLR i DLR), u ostale motoričke centre moždanog debla te natrag u talamus i moždanu koru, odnosno *pallium* (Slika 1) (Grillner i sur. 2013).

Pallium je dorzalni *telencephalon* u obliku plašta sive tvari koji obavija veliki mozak u kralješnjaka, a kod sisavaca se naziva *cortex* i smatra se da je to najreprezentativnija i najdetaljnije razvijenija struktura mozga sisavaca odgovorna za njihove naprednije moždane funkcije u odnosu na druge vrste (Medina i Abellan 2009). U *palliumu*, odnosno korteksu, nalaze se motorička područja zadužena za, primjerice, finu motoriku kao što su pokreti prstiju, te govor u čovjeka (Grillner i sur. 2013).

Neuronske mreže bazalnih ganglija organizirane su u tri različita neuronska kruga: direktni, indirektni i hiperdirektni. Svi putevi počinju s korteksom kao ulaznom točkom i završavaju jezgama GPi/SNr kao izlaznom točkom koja šalje svoje projekcije dalje u izvršne motoričke programe. Ono u čemu se ti putevi razlikuju su ostale jezgre bazalnih ganglija koje prolaze, odnosno zaobilaze.



Slika 2. Organizacija i ustrojstvo kortikobazalnih neuronskih krugova (prilagođeno prema Griller i sur. 2013).

Direktni put počinje korteksom koji glutamatergički aktivira projekcijske neurone striatuma koji eksprimiraju skupinu D1 dopaminskih receptora i tvar P (D1/SP). Ti neuroni inhibiraju jezgre GPi/SNr koje svojom inaktivacijom dezinhbiraju nizvodne motoričke programe, koji sada mogu početi izvoditi određene radnje. Isto tako se i dezinhbira povratna veza prema talamusu, koji sada aktiviran dalje ekscitira korteks što čini pozitivnu povratnu spregu.

Indirektni put također počinje korteksom, no u ovom slučaju on aktivira drugi set projekcijskih neurona u striatumu; one koji eksprimiraju skupinu D2 dopaminskih receptora i enkefalin (D2/Enk). Ti neuroni inhibiraju jezgru GPe koja inače inhibira STh, a STh, sada dezinhbirana, glutamatergičkim neuronima aktivira GPi/SNr čime taj kompleks inhibira daljnje nizvodno izvođenje motoričkih programa.

Postoji i hiperdirektni put kojim se u potpunosti zaobilazi striatum na način da korteks direktno aktivira STh koja odmah aktivira SNr/GPi. Dakle, STh je jedina jezgra koja može aktivirati SNr/GPi i time omogućiti obustavu izvođenja pokreta.

Substantia nigra pars compacta (SNc) je dopaminergička jezgra koja šalje svoje projekcije u striatum. Budući da obje vrste striatalnih neurona imaju dopaminske receptore (D1 i D2), njihova aktivacija ovisi, osim o kortikalnoj, i o dopaminergičkoj regulaciji. Oba dopaminska receptora su G-protein vezujući receptori, a razlikuju se u tome što D1 receptor aktivira G-proteine što rezultira stimulacijom proizvodnje cAMP-a čime se nizvodno dalje prenosi signal, dok kod aktivacije D2 receptora dolazi do inhibicije proizvodnje cAMP-a (Purves 2004).

Dakle, dopamin preko D1 receptora aktivira neurone striatuma koji inhibiraju GPi/SNr čime se postiže pokretanje motoričkih programa. S druge strane, preko D2 receptora, dopamin inhibira rad neurona striatuma koji inače inhibiraju GPe, što posljedično dovodi do pojačane aktivnosti neurona GPe i inhibicije neurona STh. Na taj način indirektni put se pretvara u „direktni put“, prema svojem učinku, i facilitira izvođenje pokreta.

Važnost ove složene organizacije dolazi do izražaja kod pojave neurodegenerativne Parkinsonove bolesti, gdje dolazi do propadanja dopaminergičkih neurona SNc. Kad se prekine opskrba striatuma dopaminom, D1/SP neuroni slabije rade pa ne mogu inhibicijom GPi/SNr pustiti u pogon motoričke programe za izvođenje pokreta, dok D2/Enk pojačano rade pa tako i pojačano inhibiraju GPe, što znači da dezinhibirana STh pojačano radi i zaustavlja izvođenje pokreta. Prema tome, nestašicom dopamina dolazi do narušavanja ravnoteže koja se preko dva različita puta pomiče u smjeru kočenja pokreta. Jedini put koji radi normalno jer zaobilazi striatum jest hiperdirektni put, no njegov rezultat je također obustava pokreta, što znači da zapravo sva tri puta u Parkinsonovoj bolesti dovode do toga da se pokreti ne izvode.

To posljedično znači da kod pacijenata dolazi kod do ukočenosti (*rigiditas*), trajne promjene stava tijela i mišićnog tonusa (*dystonia*), dolazi do pojave nevoljnih pokreta (*tremor*) ili do oskudnosti (*akinesia*) i usporenosti (*bradykinesia*) pokreta, što sve zajedno zovemo *hypokinesia* (Slika 3), a najpoznatiji hipokinetski sindrom je upravo Parkinsonova bolest (Judaš i Kostović 1997).



Slika 3. Karakteristično držanje osebe oboljele od Parkinsonove bolesi (Lees i sur. 2009).

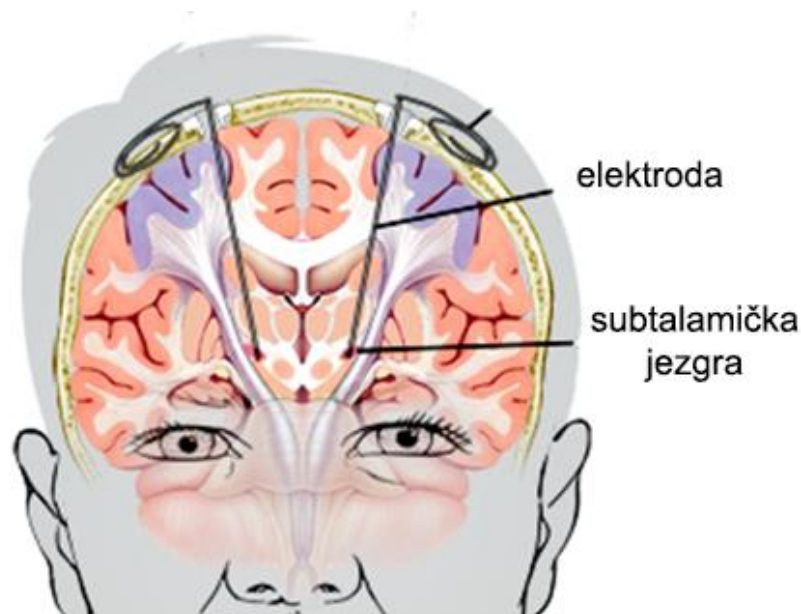
1.2. Funkcija subtalamičke jezgre

Postoji i sindrom suprotan od hipokinetskog, hiperkinetski sindrom, kod kojega prevladava pojava nevoljnih pokreta, a primjeri hiperkinetskog sindroma su Huntingtonova bolest i balizam. Kod Huntingtonove bolesti primarno dolazi do propadanja striatuma, ali i ostalih dijelova mozga, a balizam je posljedica oštećenja subtalamičke jezgre (Purves, 2004).

Budući da je subtalamička jezgra jedina struktura bazalnih ganglija koja može zaustaviti izvođenje pokreta, kod njenog oštećenja to više nije moguće pa dolazi do nekontroliranog i konstantnog izvođenja neprimjerenih pokreta jer je nemoguće napraviti selekciju ispravnog programa. Kod hemibalizma pojava nevoljnih pokreta djeluje samo na jednoj strani tijela jer je subtalamička jezgra oštećena unilateralno, dok kod balizma, zbog oštećenja subtalamičke jezgre na obje strane, dolazi do nevoljnih pokreta na obje strane tijela (Marani i sur. 2008).

Tradicionalno se Parkinsonova bolest liječi tretmanom prekursorom dopamina L-dopa (Lees i sur. 2009). Međutim, to nije dugoročno je održivo jer je pozitivan odgovor organizma na L-dopa obično relativno kratkotrajan, dolazi uz brojne nuspojave, a ne odgovaraju svi pacijenti jednako na taj tretman, niti uopće on pomaže svim tipovima parkinsonizama (Lees i sur. 2009). Ideja suvremenijeg liječenja Parkinsonovih simptoma je da se u pacijenata izazove hiperkinezija kao protuteža hipokineziji, na način da se izazove lezija u nekoj komponenti kortikobazalnih puteva te se time njihova regulacija dovede približno natrag u ravnotežu (Marani i sur. 2008).

Prvo su se 1980-ih godina radile rutinske lezije ventralnog intermedijarnog talamusa, sve dok Benabid i sur. (1989) nisu otkrili da se stimulacijom tkiva fiziološkim frekvencijama (20-30 Hz) može postići reverzibilna „lezija“ tkiva koja može poništiti tremor, te da stimulacija subtalamičke jezgre daje bolje rezultate u liječenju tremora od stimulacije ventrointermedijarnog talamusa (Benabid i sur. 2000). Time se dubokomozgovna stimulacija subtalamičke jezgre (DBS) uspostavila kao standardna metoda liječenja Parkinsonove bolesti (Slika 4) koja se koristi paralelno s farmakološkim tretmanom, prekursorom L-dopa (Marani i sur. 2008).



Slika 4. Shematski prikaz bilateralne dubokomozgovne stimulacije subtalamičke jezgre (Prilagođeno i preuzeto sa <https://mayfieldclinic.com/>).

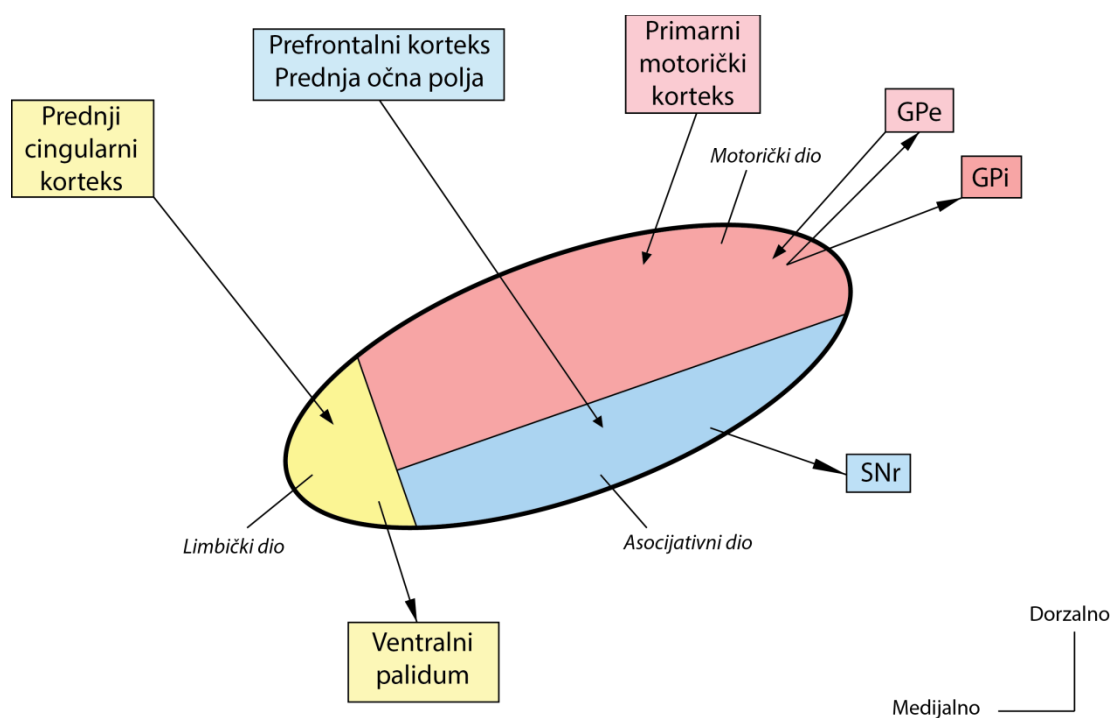
Uspješan tretman DBS-om obično rezultira u 60-postotnom smanjenju motoričkog invaliditeta te se time i potrebna dnevna doza levodope može smanjiti za 60%. Ono što je do danas ostao problem je činjenica da to poboljšanje u motoričkim simptomima nije nužno popraćeno i sa poboljšanjem mentalnih funkcija. Naime, pacijenti nakon tretmana DBS-om dožive pogoršanja kognitivnih funkcija kao što su promjene u verbalnom pamćenju, poremećena tečnost govora, poremećaj pažnje, poremećena radna memorija, te općenita mentalna usporenost. Osim toga, dožive i niz poremećaja limbičkih funkcija kao što su promjene u osobnosti, depresija, suicidalnost, hiperseksualnost, manija, hipomanija, anksioznost i halucinacije (Temel i sur. 2005).

Iako je subtalamička jezgra očigledno klinički važna i složena struktura koja regulira motoričke, kognitivne i limbičke krugove, vrlo malo je o njoj zapravo poznato jer je godinama bila zapostavljena u istraživanjima, te se tek pojavom DBS-a, a i godinama nakon toga, počinje shvaćati njezin stvarni značaj. To se jednim dijelom može pripisati i prevladavajućem tradicionalnom kortikocentričnom razmišljanju koje je još od 19. stoljeća ukorijenjeno u neuroznanost, zbog kojeg znanstvenici, svjesno ili nesvjesno, smatraju da je korteks superiorna struktura u (pogrešnom) hijerarhijskom pogledu na organizaciju mozga, pa u svojim istraživanjima sustavno zanemaruju ulogu subkortikalnih struktura u kognitivnim funkcijama (Parvizi 2009).

1.3. Struktura subtalamičke jezgre

Subtalamička jezgra smještena je ventralno od talamusa, a lateralno od hipotalamusa. Bikonveksnog je, ovalnog, oblika i okružena je bijelom tvari - mijeliniziranim vlaknima zone incerte (ZI) i cerebralnog pedunkula (cp), a tamnije je obojena zbog nakupina granula pigmenta lipofuscina (Marani i sur. 2008).

U većini radova prihvaćena je takozvana tripartitna podjela subtalamičke jezgre, gdje je ona funkcionalno podijeljena na medijalni limbički dio, dorzolateralni motorički dio, te ventrolateralni asocijativni dio (Slika 5).



Slika 5. Tripartitna podjela subtalamičke jezgre (Prilagođeno prema Benarroch 2008).

Međutim, ne slažu se svi s takvom podjelom - neki radovi se razlikuju u stajalištima oko podjele STh, gdje broj podjedinica na koju se STh može podijeliti varira od 0 do 4 kod primata, ovisno o radu (Keuken i sur. 2012).

U glodavaca je jezgra otvorenog tipa, što znači da dendriti sežu izvan granica jezgre u druga područja (zona incerta, lateralni hipotalamus, cerebralni pedunkul), dok je kod mačaka i primata zatvorenog tipa, što znači da je doseg dendrita ograničen na samu jezgru (Marani i sur. 2008).

Veličina štakorske subtalamičke jezgre je 0.8 mm^3 , dok je kod čovjeka povećana na 240 mm^3 . S druge strane, gustoća stanica u jezgri se od štakora do čovjeka smanjuje, pa tako jezgra štakora sadrži oko $30\,000 \text{ stanica/mm}^3$, dok ljudska ima samo $2\,300 \text{ stanica/mm}^3$ (Marani i sur. 2008).

Subtalamička jezgra je ekscitacijska jezgra koja primarno sadrži projekcijske glutamatergičke neurone. U ljudskoj subtalamičkoj jezgri postoje dvije vrste neurona: veći, magnocelularni, te manji, parvocelularni neuroni. Magnocelularni neuroni su glutamatergički projekcijski neuroni, dok su mali parvocelularni neuroni zapravo GABA-ergički interneuroni (Levesque i Parent 2005), koji se također vjerojatno nalaze i u jezgri ostalih primata te mačaka, dok kod glodavaca nisu uočeni (Marani i sur. 2008).

1.4. Citokemija subtalamičke jezgre

Struktura STh se može dalje specificirati koristeći molekularne metode istraživanja koje omogućuju razlikovanje diferencijacije tkiva do stanične razine. Podaci o ekspresiji gena u subtalamičkoj jezgri variraju od vrste do vrste jer je ekspresija različitih gena analizirana u različitim vrstama. Pregled nekih istraživanja prikazan je u Tablici 1 (Philips i sur. 2005). Još jedna komplikacija je i to da su različita istraživanja koristila različite metode, većinom *in situ* hibridizaciju (ISH), čime se potvrđuje prisutnost mRNA no to nije ujedno i dokaz ekspresije odnosno translacije samog proteina. Također, prisutnost proteina ili mRNA u jednoj vrsti ne mora značiti da će protein odnosno mRNA biti prisutna u drugoj vrsti.

Tablica 1. Podaci od ekspresiji gena u odrasloj subtalamičkoj jezgri (Prilagođeno prema Philips i sur. 2005).

Gen	Vrsta	Funkcija	Metoda
<i>CROC-4</i>	Čovjek	Transkripcijski faktor	Northern blot
<i>Pitx2</i>	Štakor, Miš	Transkripcijski faktor	ISH
<i>Lmx1b</i>	Miš	Transkripcijski faktor	ISH
<i>Ldb1</i>	Miš	Kofaktor za LMX1B	ISH
<i>Foxp1</i>	Miš	Transkripcijski faktor	ISH
<i>c-fos</i>	Štakor	Rani gen	ISH, IHC
<i>Znf268</i>	Štakor	Rani gen	ISH
<i>Cdh8</i> (Kadherin-8)	Miš	Adhezijski protein	ISH
<i>Calb2</i> (Kalretinin)	Čovjek	Kalcij-vezujući protein	ISH, IHC
<i>Pvalb</i> (Parvalbumin)	Čovjek	Kalcij-vezujući protein	ISH, IHC
<i>ErbB4</i>	Štakor	Receptor neuregulina	ISH
<i>Ret</i>	Štakor	Receptor tirozin kinaze	ISH
<i>GluR6, GluR7</i>	Miš, Štakor	Glutamatski receptori	ISH
<i>MGluR1, MGluR5</i>	Štakor	Glutamatski receptori	IHC
<i>MGluR2, MGluR3</i>	Štakor	Glutamatski receptori	IHC
<i>NMDAR1</i>	Štakor	Glutamatski receptor	ISH
<i>Drd5</i>	Miš, Štakor	Dopaminski receptor	IHC
<i>Drd4</i>	Čovjek	Dopaminski receptor	ISH
<i>Drd1/2/3</i>	Štakor, Čovjek	Dopaminski receptor	RT-PCR, ISH
<i>GABRA1/2/3</i>	Štakor, Rezus makaki	Podjedinica GABA-A receptora	ISH
<i>GABRG2</i>	Štakor, Rezus makaki	Podjedinica GABA-A receptora	ISH
<i>SLC6A1</i>	Čovjek	GABA transporter	ISH

Poznato je da većina neurona subtalamičke jezgre eksprimira neuronalnu sintazu dušikovog oksida (nNOS) (Marani i sur. 2008). Dušikov oksid (NO) je nekonvencionalni neurotransmiter koji, budući da je plin, može difundirati kroz membrane i djelovati retrogradno na presinaptičke neurone, ali i anterogradno na postsinaptičke neurone. Ima i funkciju neuromodulatora što znači da regulira otpuštanje drugih neurotransmitera u sinapsu. NO ima važnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti i procesu učenja koji se zove dugoročna potencijacija (eng. *long term potentiation*, LTP) a odnosi se na ojačavanje sinapsi između neurona (Zhou i Zhu 2009).

Oko 95% ljudskih subtalamičkih neurona eksprimira mRNA za nNOS (Nisbet i sur. 1994), dok ih oko 90% eksprimira sami protein (Santos-Lobato i sur. 2016). Ekspresija mRNA za nNOS značajno je povećana kod Parkinsonovih pacijenata u odnosu na kontrolne (Eve i sur. 1998), a isto tako, broj nNOS–pozitivnih neurona se kod štakora povećava sa starosnom dobi (Cha i sur. 2000), zbog čega se pretpostavlja da NO ima neku ulogu i u patogenezi Parkinsonove bolesti.

Kalcij-vezujući proteini reguliraju unutarstanične razine kalcija a time i elektrofiziološku aktivnost samih neurona. Široko su rasprostranjeni u središnjem živčanom sustavu te se koriste kao markeri za klasifikaciju i fenotipizaciju neurona s obzirom na to koji od tri kalcij-vezujuća proteina (parvalbumin, kalbindin i kalretinin) eksprimiraju. U subtalamičkoj jezgri čovjeka najčešće ekspimiran protein je parvalbumin, dok kalretinina ima mjestimično, a kalbindina nema uopće (Marani i sur. 2008, Philips i sur. 2005).

1.5. Razvoj subtalamičke jezgre

Razvoj subtalamičke jezgre i njezinih neurona nije do kraja razjašnjen. Herrick je 1910. prvi opisao razvoj diencefalona kod gmazova i reptila te ga podijelio u četiri razvojne zone: epitalamus, dorzalni talamus, ventralni talamus i hipotalamus. Nakon njega, Kahle (1956) i Richter (1965, 1966) su u svojim radovima razvoju diencefalona dodali još jednu zonu, subtalamičku, koja je smještena između ventralnog talamusa i hipotalamusa, a takva podjela razvojnih zona diencefalona prihvaćena je do danas.

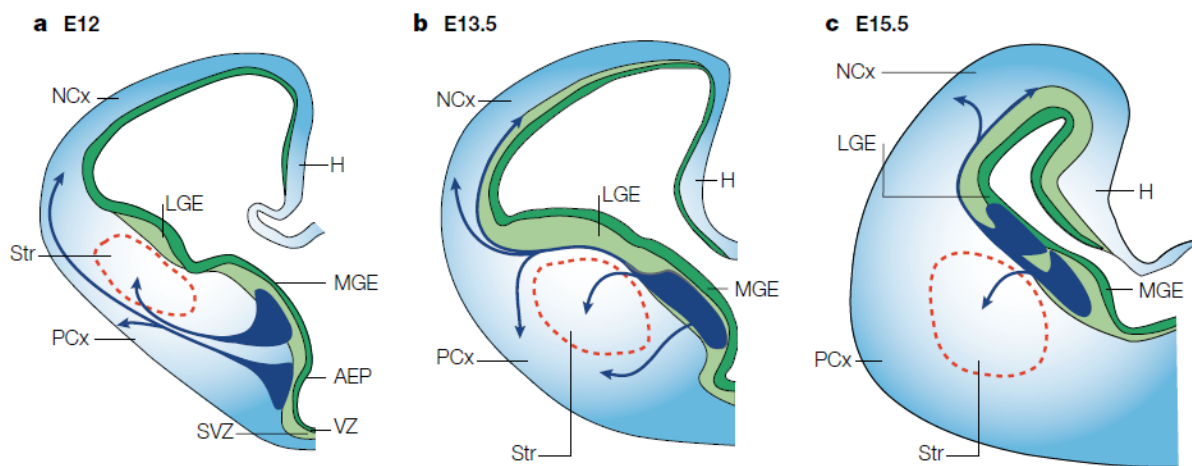
Trenutačno u literaturi postoje različita stajališta o mjestu razvoja subtalamičkih neurona. Jedno od stajališta je da se subtalamički neuroni razvijaju u području koje leži odmah kaudalno od mamilarne jezgre, te iz tog područja migriraju radijalno, zatim tangencijalno te na kraju dorzalno uz marginalnu zonu ventralnog diencefalona sve do razine strio-tegmentalnog trakta gdje tvore buduću subtalamičku jezgru. (Gilbert 1935, Papez 1940, Keyser 1972, Marchand 1987, Philips i sur. 2005, Marani i sur. 2008).

Drugo stajalište oslanja se na podjelu diencefalona na pet zona. Prema tome se subtalamički neuroni razvijaju od subtalamičke longitudinalne zone smještene između ventralnog talamusa i hipotalamusa, odakle migriraju do mjesta buduće subtalamičke jezgre. (Herrick 1910, Kahle 1956, Richter 1965 i 1966, Müller i O’Rahilly 1988 i 1990).

Uz to su se zadnjih godina pojavile i sumnje u diencefaličko porijeklo subtalamičke jezgre uopće. Naime, na temelju analiza ekspresije gena pojavile su se tvrdnje da se globus pallidus, za kojeg se smatralo da nastaje od diencefalona, razvija od telencefaličke osnove, točnije medijalnog ganglijskog brežuljka (eng. *medial ganglionic eminence*, MGE) (Puelles 2001, Nunta-Aree 2001). Kako klasični radovi navode da se *globus pallidus* i subtalamička jezgra razvijaju iz iste osnove, sumnje o diencefaličkom porijeklu *globus pallidusa* posljedično dovode i do sumnji u porijeklo same subtalamičke jezgre.

Novija studija „*single-cell*“ RNA-sekvenciranja (sekvenciranje RNA na razini jedne stanice) progenitorskih stanica ventralnog mezencefalona i diencefalona mišjih embrija pokazala je kako se jedan dio Lmx1a-pozitivnih progenitora diferencira u neuronsku liniju koja potencijalno odgovara subtalamičkoj jezgri, dok drugi odgovara liniji mezencefaličkih dopaminergičkih neurona, što je pokazalo kako je moguće da subtalamička i dopaminergička linija zapravo imaju zajedničko porijeklo. Jedan od gena po čijoj se ekspresiji te linije razlikuju, je Nkx2.1, prisutan u subtalamičkoj liniji. (Kee i sur. 2017).

Nkx2.1 je transkripcijski faktor i koristi se kao razvojni marker medijalnog ganglijskog brežuljka (MGE), prolazne strukture embrionalnog ventralnog telencephalona (Slika 6.), koja proizvodi GABA-ergičke interneurone, koji kasnije migriraju u korteks (Lim i sur. 2018), striatum (Marin 2000), talamus (Letinić i Rakić 2001) i palidum (Nobrega-Pereira 2010), zatim strijatalne kolinergičke neurone (Marin 2000), te palidalne projekcijske neurone (Nobrega-Pereira 2010). Štoviše, u knock-out miševima s inaktivacijom gena Nkx2.1, nesuđeni *globus pallidus* transformira se u striatum (Sussel 1999).



Slika 6. Shematski prikaz migracije neurona iz MGE u embrionalnim stadijima miša (a. E12, b. E13.5, c. E15.5). NCx, neokorteks; PCx, piriformni korteks; Str, striatum; LGE, lateralni ganglijski brežuljak; MGE, medijalni ganglijski brežuljak; H, hipokampus; SVZ, subventrikularna zona; VZ, ventrikularna zona; AEP, anteriorno endopedunkularno područje. (Marin i Rubenstein 2001).

U literaturi do sada nije opisana mogućnost da dio subtalamičkih neurona migrira iz MGE. Pošto je već pokazano kako neuroni iz MGE mogu migrirati i između razvojnih mjehurića (Letinić i Rakić 2001), a ne samo unutar njih, postoji mogućnost da se to događa i u subtalamičkoj jezgri.

Rezultati studija provedenih isključivo na prenatalnim uzorcima mišjeg mozga ne mogu se ekstrapolirati za predviđanje molekularnog profila subtalamičke jezgre odraslog mozga, niti se mogu ekstrapolirati na druge vrste. Isto tako, dokaz ekspresije mRNA nije dokaz ekspresije proteina. Stoga je cilj ovog rada utvrditi prisutnost i prostornu raspodjelu proteina Nkx2.1 u subtalamičkoj jezgri odraslog mozga, i miša i štakora, te fenotipizirati Nkx2.1-pozitivne stanice kolokalizacijom s proteinima parvalbumin i nNOS.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

1. Utvrditi ekspresiju i prostornu raspodjelu proteina Nkx2.1 u subtalamičkoj jezgri odraslog mozga miša i štakora.
2. Utvrditi ekspresiju i prostornu raspodjelu proteina parvalbumina u subtalamičkoj jezgri odraslog mozga miša i štakora.
3. Utvrditi ekspresiju i prostornu raspodjelu proteina nNOS u subtalamičkoj jezgri odraslog mozga miša i štakora.
4. Utvrditi ko-lokalizaciju proteina Nkx2.1 i parvalbumina u subtalamičkim neuronima miša i štakora.
5. Utvrditi ko-lokalizaciju proteina Nkx2.1 i nNOS u subtalamičkim neuronima kod miša i štakora.
6. Usporediti ekspresiju analiziranih markera između miša i štakora u svrhu određivanja evolucijskih razlika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje

U sklopu ovog istraživanja korišteni su uzorci mozga odraslih muških jedinki laboratorijskog miša (*Mus musculus*, soj C57BL/6) i štakora (*Rattus norvegicus*, soj Wistar Han®(RccHan®:WIST)) starosti 3,5 mj. Životinje su bile smještene u nastambi za životinje na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga (HIIM) u polisulfonatnim prozirnim kavezima gdje su imale pristup hrani (Mucedola) i vodi *ad libitum*, a stelja im se mijenjala na tjednoj bazi. Svaki kavez bio je označen karticom na kojoj je pisao broj životinja u njemu, spol, dob, soj i datum okota. Temperatura u prostoriji održavana je na 22-24°C, relativna vlažnost 50-60%, a ciklusi svjetla i tame bili su 12-12h. U kavezu je bilo 3 (štakora) do 5 jedinki (miševa) uz obogaćenu okolinu. Korištenje životinja i protokola za uzorkovanje mozga rađeno je prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13 i 39/17) Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede.

3.2. Fiksacija tkiva transkardijalnom perfuzijom

U sklopu ovog istraživanja korišteno je po 5 uzoraka mozga muških jedinki od svake navedene vrste. Miševi (mase 25-30 g) i štakori (mase 350-400 g) bili su anestetizirani smjesom ketamina i ksilazina u dozi od 0,1 mL/10 g tjelesne mase za miševe te 0,2 mL/100 g tjelesne mase za štakore. Po provjeri refleksa i potvrdi anestezije, životinje su bile transkardijalno perfundirane otopinom 1x PBS-a i 4% paraformaldehida (prema Gage 2012). Nakon završene perfuzije mozgovi su bili uklonjeni i stavljeni u 4% otopinu paraformaldehida 48 sati. Nakon toga, svaki je uzorak prošao postupak dehidracije u uzlaznoj seriji alkohola te je na kraju uklopljen u parafin niskog tališta.

3.3. Rezanje tkiva

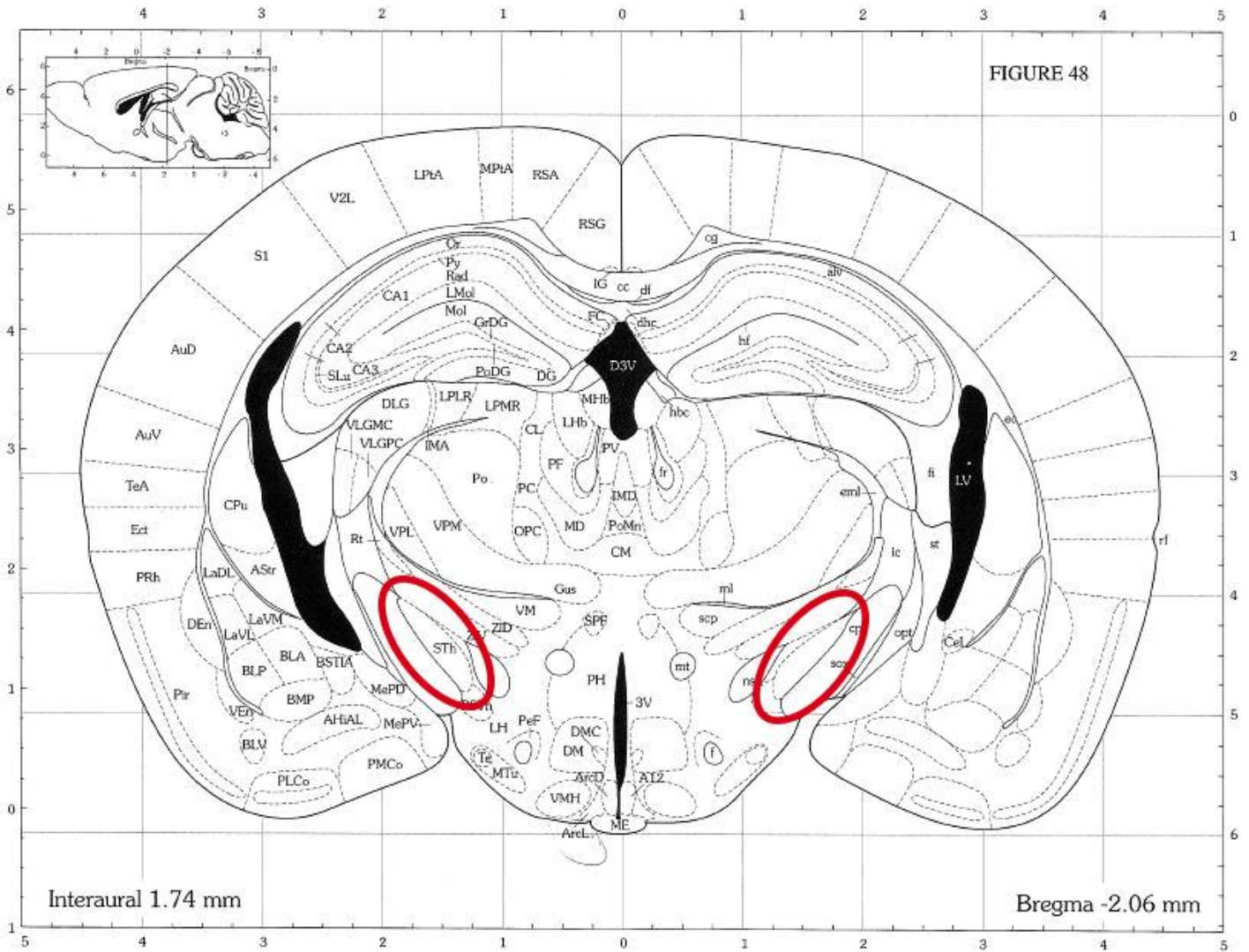
Uzorci su rezani u koronarnoj ravnini, na debljinu od 10 µm za miševe, te 12 µm za štakore pomoću kliznog mikrotoma (Microm HM 450, Thermo Scientific), nakon čega su se navukli na silanizirana predmetna stakalca (Vitrognost).

3.4. Bojanje tkiva Nisslovom metodom

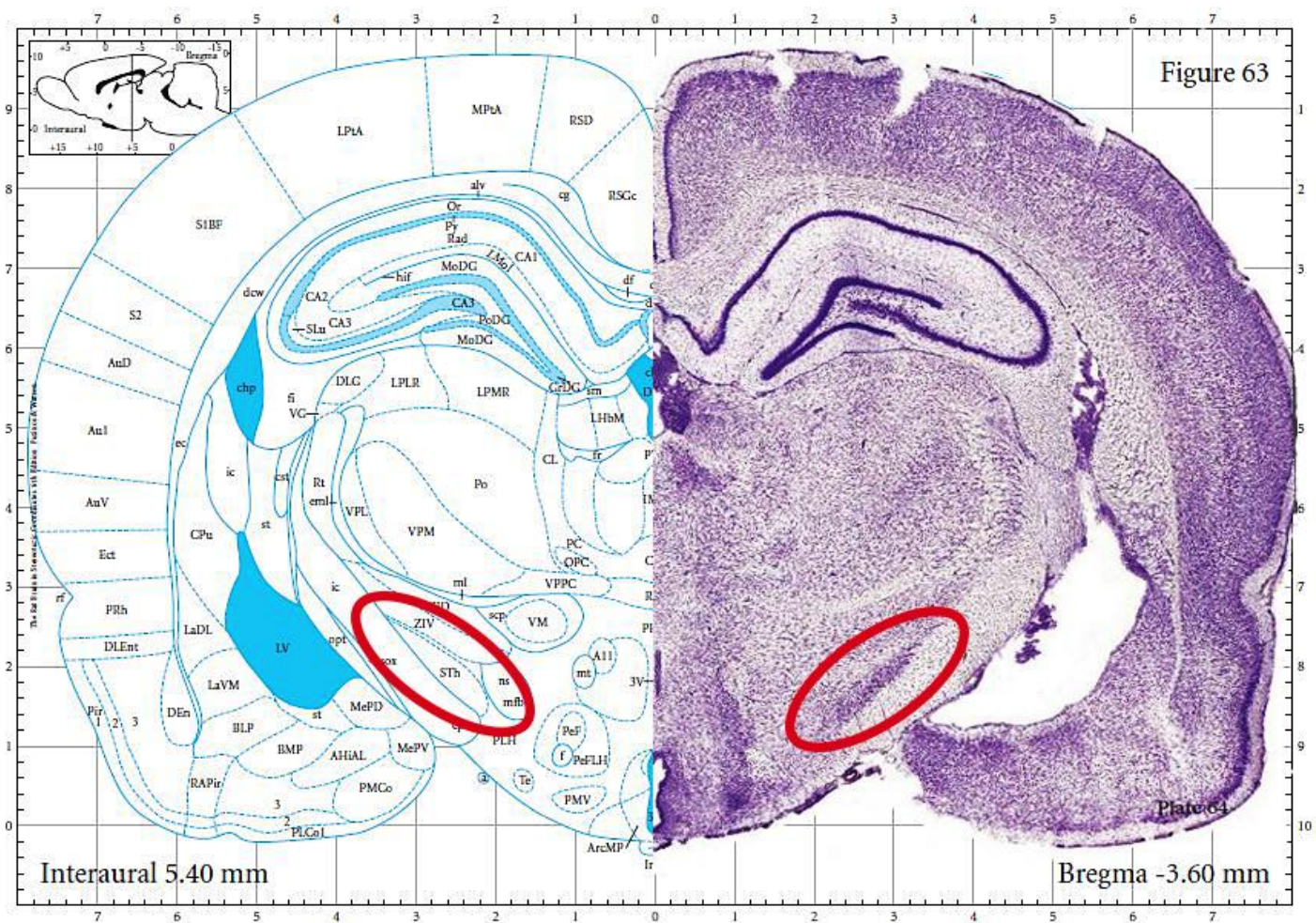
Kako bi se odredila točna pozicija subtalamičke jezgre na uzorcima, neki preparati su se bojali Nisslovom metodom koja obilježava nukleinske kiseline pa se koristi za bojanje jezgara svih stanica na preparatu. Uzorci se prvo deparafiniziraju tretiranjem u nizu alkohola (Kemika), prvo dva puta po deset minuta u ksilolu, zatim dva puta po pet minuta u 100%-tnom etanolu, zatim 96%-tnom, pa 70%-tnom, nakon čega se prenesu u destiliranu vodu. Sljedeći korak je tretman 0,5%-tnom otopinom krezil-violeta razrijeđenom u destiliranoj vodi u omjeru 1:4 koji traje do postizanja željenog intenziteta boje (obično minutu-dvije). Nakon toga se uzorci isperu destiliranom vodom, pa 70%-tnim etanolom. Uzorci se zatim ispiru u kiselom alkoholu (70%-tni etanol u koji se doda nekoliko kapi 10%-tne octene kiseline). Sljedeći korak je dehidracija, pa se uzorci prenose u 70%-tni, 96%-tni, 100%-tni etanol i na kraju u ksilol. Gotovi preparati nakapaju se pokrivalom Poly-Mount (Polysciences, Inc.) i prekriju pokrovnim stakalcem.

3.5. Određivanje položaja subtalamičke jezgre na uzorcima

Rezovi koji se nalaze od -3.12 do -4.2 mm (kod štakora) odnosno od -1.7 do -2.3 mm (kod miša) od bregme bili su uključeni u studiju. To se utvrdilo uspoređivanjem obojenih preparata s anatomskim atlasom mozga miša (Slika 7, Paxinos i Franklin 2004) i štakora (Slika 8, Paxinos i Watson 2007).



Slika 7. Položaj subtalamičke jezgre (zaokružen crveno) u mozgu miša prema anatomskom atlasu (Paxinos i Franklin 2004).



Slika 8. Položaj subtalamičke jezgre (zaokružena crveno) u mozgu štakora prema anatomskom atlasu (Paxinos i Watson 2007).

3.6. Imunohistokemija – metoda avidin-biotin kompleks (ABC)

U svrhu određivanja uzorka ekspresije pojedinačnih proteina korištena je imunohistokemijska metoda avidin-biotin kompleks (ABC). Za detekciju proteina korištena su sljedeća primarna protutijela:

1. Anti-Nkx2.1 (anti-TTF1), Abcam, kataloški broj: ab133737
2. Anti-Parvalbumin, Abcam, kataloški broj: ab11427
3. Anti-nNOS, Merck/Millipore, kataloški broj: AB5380

Za detekciju svakog pojedinačnog proteina, od svakog mozga uzeta su barem po tri uzorka kako bi se obuhvatili anteriorni, središnji i posteriorni dijelovi subtalamičke jezgre. Kada se radi o četiri reza, onda su dva središnja reza antgeriorni središnji i posteriorni središnji dio. Osim toga, preostali rezovi iskorišteni su kao negativne kontrole (bez primarnog protutijela).

Protokol ABC metode je sljedeći:

1. Deparafinizacija: Xylol 2x10 min
100% etanol 2x5 min
96% etanol 2x5 min
70% etanol 1x5 min
2. Staviti preparate u fosfatni pufer (1xPBS) 10 min na sobnoj temperaturi (RT).
3. Kuhanje preparata u citratnom puferu (pH 6.0) u mikrovalnoj pećnici, prvo zakuhati pufer na 700W do ključanja, pa kuhati 5 puta uz dodavanje destilirane vode da se smanji ključanje, nakon čega se kuha još 20 minuta na 350W.
4. Hlađenje na RT u istom puferu 30 min.
5. Ispiranje u 1xPBS 3x5 min.
6. Predtretman smjesom metanola, vodikovog peroksida i destilirane vode (300:0.3:100) 30 min na RT. Metanol (Kemika) uništava krvne žile u tkivu, a vodikov peroksid inaktivira endogene peroksidaze.
7. Ispiranje u 1xPBS 3x5 min.

8. *Blocking* (5% BSA (albumin iz goveđeg seruma, eng. *bovine serum albumin*, Capricorn Scientific GmbH) + 0.5% TRITON X-100 (Sigma) u 1xPBS) nakapa se na tkivo i inkubira u vlažnoj komori 1h na RT.
9. Primarno protutijelo se razrijedi u otopini *blocking* prema preporučenoj koncentraciji, nakapa se na tkivo i preko noći se ostavi na 4° C u vlažnoj komori.
10. Ispiranje u 1xPBS 4x5 min.
11. Sekundarno protutijelo IgG (Vectastain ABC kit) razrijedi se u razrijeđenoj otopini *blocking* (1:1 s 1XPBS-om) do koncentracije 1:200 te s nakapa na protutijelo i inkubira u vlažnoj komori 1h na RT.
12. Ispiranje u 1xPBS, 4x5 min.
13. Tercijarna protutijela Avidin i Biotin (Vectastain ABC kit), pomiješaju se u razrijeđenoj otopini *blocking*, 1:200 Avidin i 1:200 Biotin, te se inkubiraju tako 30 min da se avidin i biotin spoje u kompleks. Nakon toga, mješavina se nakapa na tkivo i inkubira u vlažnoj komori 1h na RT.
14. Ispiranje u 1xPBS, 4x5 min.
15. Pripremi se otopina diaminobenzidina i vodikovog peroksida (SIGMAFAST DAB with Metal Enhancer tablet, Sigma), što pokreće proces oksidacije DAB-a. Pripremljena otopina nakapa se na tkivo i inkubira se dok se boja ne razvije. Iskorištenu otopinu, budući da je DAB karcinogen, potrebno je neutralizirati natrijevim hipokloritom.
16. Ispiranje u 1xPBS 4x5 min.
17. Ispiranje u destiliranoj vodi 5 min.
18. Sušenje preko noći.
19. Inkubirati preparate u otopini za prosvjetljavanje Clear-Advantage (Polysciences, Inc.) 2x10 min.
20. Nakapati pokrivalom Poly-Mount (Polysciences, Inc.) i pokriti pokrovnim stakalcem.

3.7. Imunofluorescencija s dvostrukim obilježavanjem

U svrhu određivanja ko-lokalizacije proteina korištena je imunofluorescencijska metoda dvostrukog obilježavanja. Za detekciju proteina korištena su sljedeća primarna protutijela:

1. Mouse anti-Nkx2.1 (anti-TTF-1), Invitrogen, kataloški broj: MA5-13961
2. Rabbit anti-Parvalbumin, Abcam, kataloški broj: ab11427
3. Rabbit anti-nNOS, Merck/Millipore, kataloški broj: AB5380

Na dijelu preparata je napravljena imunofluorescencija s crveno obilježenim proteinom Nkx2.1 i zeleno obilježenim parvalbuminom. Na drugom dijelu preparata je napravljena imunofluorescencija s crveno obilježenim proteinom Nkx2.1 dok je zeleno obilježen protein nNOS. Ostatak preparata je iskorišten kao negativna kontrola za sekundarna protutijela (crveno i zeleno).

Korištena su sljedeća sekundarna protutijela:

1. Donkey anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488, Invitrogen (ThermoFisher Scientific)
2. Donkey anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 555, Invitrogen (ThermoFisher Scientific)

Protokol ABC metode je sljedeći:

1. Deparafinizacija: Xylol 2x10 min
100% etanol 2x5 min
96% etanol 2x5 min
70% etanol 1x5 min
2. Staviti preparate u fosfatni pufer (1xPBS) 10 min na sobnoj temperaturi (RT).
3. Kuhanje preparata u citratnom puferu (pH 6.0) u mikrovalnoj pećnici, prvo zakuhati pufer na 700W, pa kuhati 5 puta uz dodavanje destilirane vode da se smanji ključanje, nakon čega se kuha još 20 minuta na 350W.
4. Hlađenje na RT u istom puferu 30 min.
5. Ispiranje u 1xPBS + 0.1% TRITON X-100 (Sigma), 3x5 min.

6. *Blocking* (1% BSA (albumin iz goveđeg seruma, eng. *bovine serum albumin*, Capricorn Scientific GmbH) + 0.5% TRITON X-100 (Sigma) u 1xPBS) u 1xPBS, nakapa se na tkivo i inkubira u vlažnoj komori 1h na RT.
7. Primarna protutijela se razrijede u *blockingu* prema preporučenoj koncentraciji, nakapaju se na tkivo, ostavi se na RT u vlažnoj komori 48 h.
8. Ispiranje u 1xPBS + 0.1% TRITON X-100, 4x5 min.
9. Sekundarna protutijela razrijede se u razrijeđenom *blockingu* (1:1 s 1xPBS-om) do koncentracije 1:500 te se nakapaju na preparat i inkubiraju u vlažnoj komori 2h na RT, u mraku.
10. Ispiranje u 1xPBS, 4x5 min.
11. Nakapati pokrivalom koje sadržava DAPI (4',6-diamidino-2-fenillindol; molekula koja se veže za DNA čime obilježava jezgre stanica) (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories) i pokriti pokrovnim stakalcem.

3.8. Mikroskopija

Preparati dobiveni Nissl bojanjem, kao i ABC metodom imunohistokemije analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Olympus AX70 - Olympus-PROVIS sustav s Nikon Eclipse DXM 1200 kamerom). Preparati zadovoljavajuće kvalitete digitalizirani su koristeći skener Hamamatsu NanoZoomer 2.0 RS. Preparati dobiveni imunofluorescencijom s dvostrukim obilježavanjem vizualizirani su i digitalizirani fluorescentnim mikroskopom Olympus IX3 sa ORCA flash 4.0 kamerom.

3.9. Obrada slika

Fotografije, slike i prikazi obrađeni su pomoću NanoZoomer Digital Pathology, Adobe Photoshop i Adobe Illustrator programskih paketa.

3.10. Bioinformatička analiza

Preko genomskog pretraživača Ensembl (ensembl.org, Hunt i sur. 2018) preuzete su sekvence gena, transkripata, netranslatiranih regija mRNA (eng. *untranslated region*, UTR) i kodirajuće (eng. *coding sequences*, CDS) regije gena Nkx2.1 vrsta *Mus musculus* i *Rattus norvegicus*, a navedene su u priložima na kraju ovog rada.

Svi tipovi sekvenci uspoređeni su između miša i štakora globalnim poravnavanjem parova (eng. *pairwise alignment*) koristeći EMBOSS Needle alat (Madeira i sur. 2019, https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). EMBOSS Needle alat koristi algoritam Needleman-Wunsch kojim pokušava dinamičkim programiranjem poravnati sekvence tako da budu najslabije, odnosno tako da je uveden najmanji mogući broj promjena (supstitucija, insercija ili delecija). Konačan rezultat poravnanja boduje se sa dva parametra: sličnost (eng. *similarity*) i identičnost (eng. *identity*), pri čemu se identičnost odnosi na udio karaktera koji su identični među sekvencama, dok se sličnost odnosi na općenito podudaranje sekvenci pa uz identičnost uključuje i dužinu njihovog poravnanja.

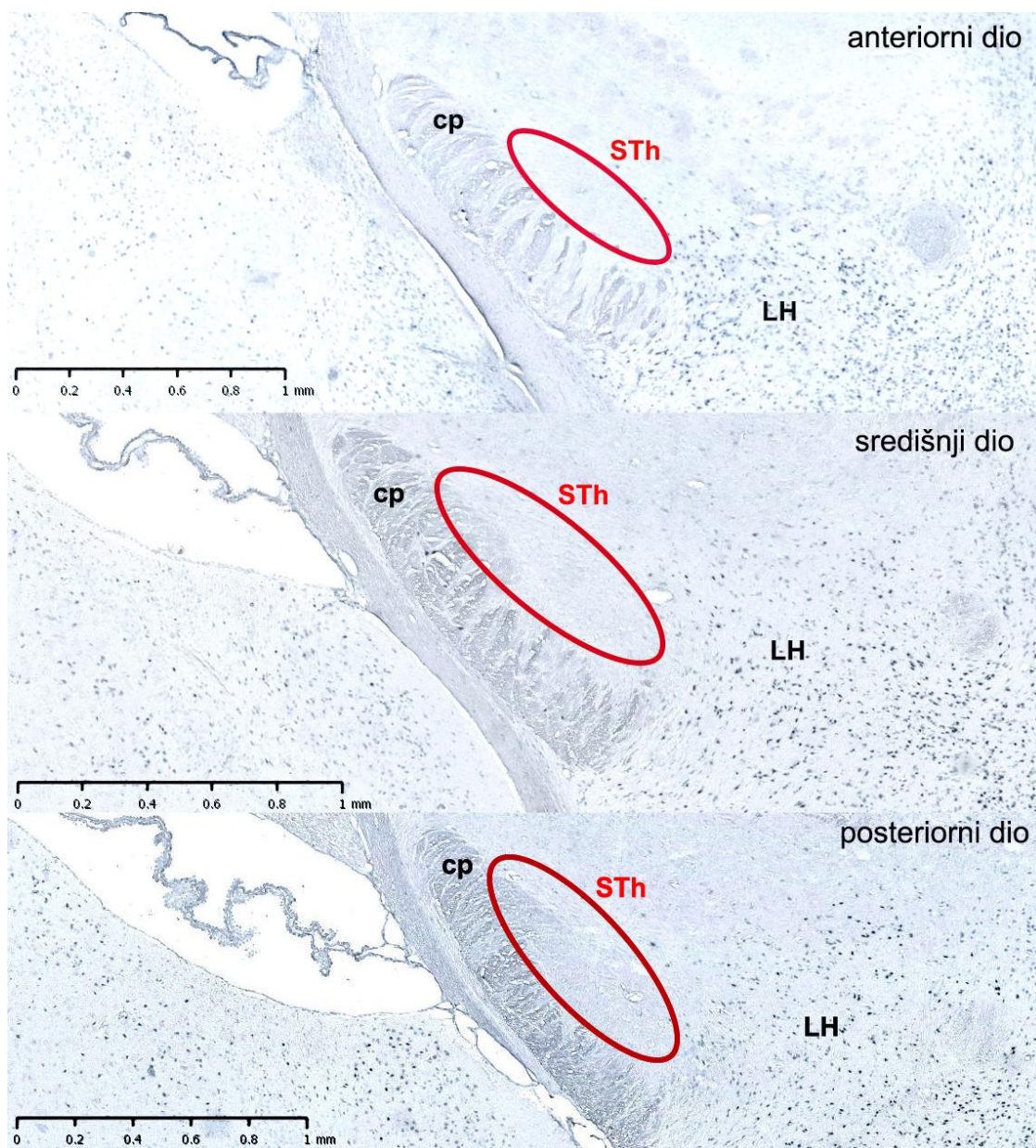
Za predviđanje veznih mjesta za RNA-vezujuće proteine na UTR sekvencama korišten je alat RBPmap (Paz i sur. 2014, <http://rbpmap.technion.ac.il/>).

4. REZULTATI

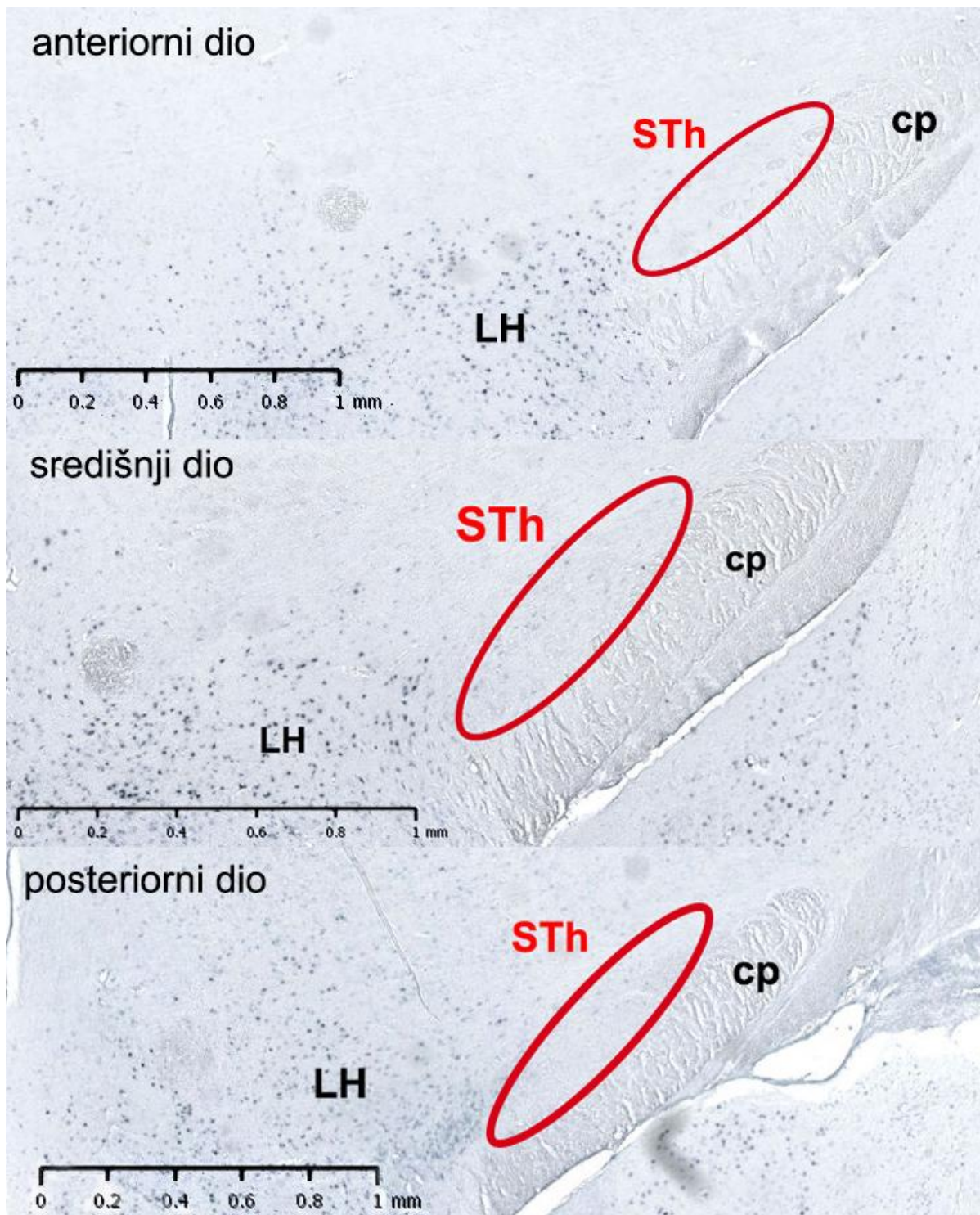
4.1. Rezultati dobiveni na tkivu miša

4.1.1. Ekspresija proteina Nkx2.1

U subtalamičkoj jezgri miša nije utvrđena ekspresija proteina Nkx2.1. Protutijelo radi ispravno, što se može vidjeti prema tome što su obilježene jezgre stanica lateralnog hipotalamusa (LH), no subtalamička jezgra je u svim svojim dijelovima negativna na Nkx2.1 (Slike 10 i 11).



Slika 10. Ekspresija proteina Nkx2.1 na uzorcima miša 1. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul; LH, lateralni hipotalamus. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; lateralno, lijevo; medijalno, desno.

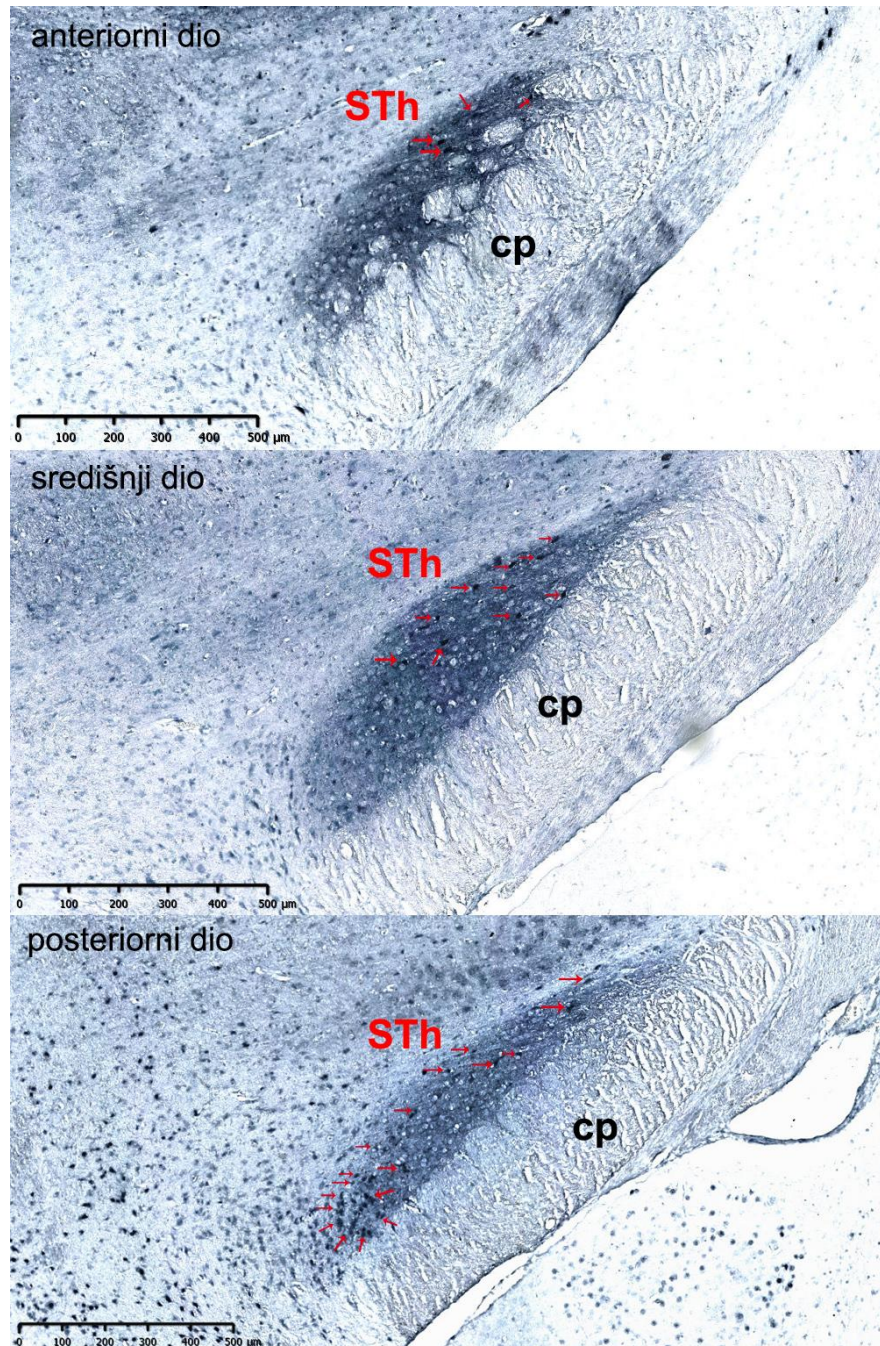


Slika 11. Ekspresija proteina Nkx2.1 na uzorcima miša 2. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul; LH, lateralni hipotalamus. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.

S obzirom na to da u subtalamičkoj jezgri miša nema proteina Nkx2.1, imunofluorescencija s dvostrukim obilježavanjem, da bi se odredila kolokalizacija Nkx2.1 s drugim proteinima, nije dalje rađena na mišjim uzorcima.

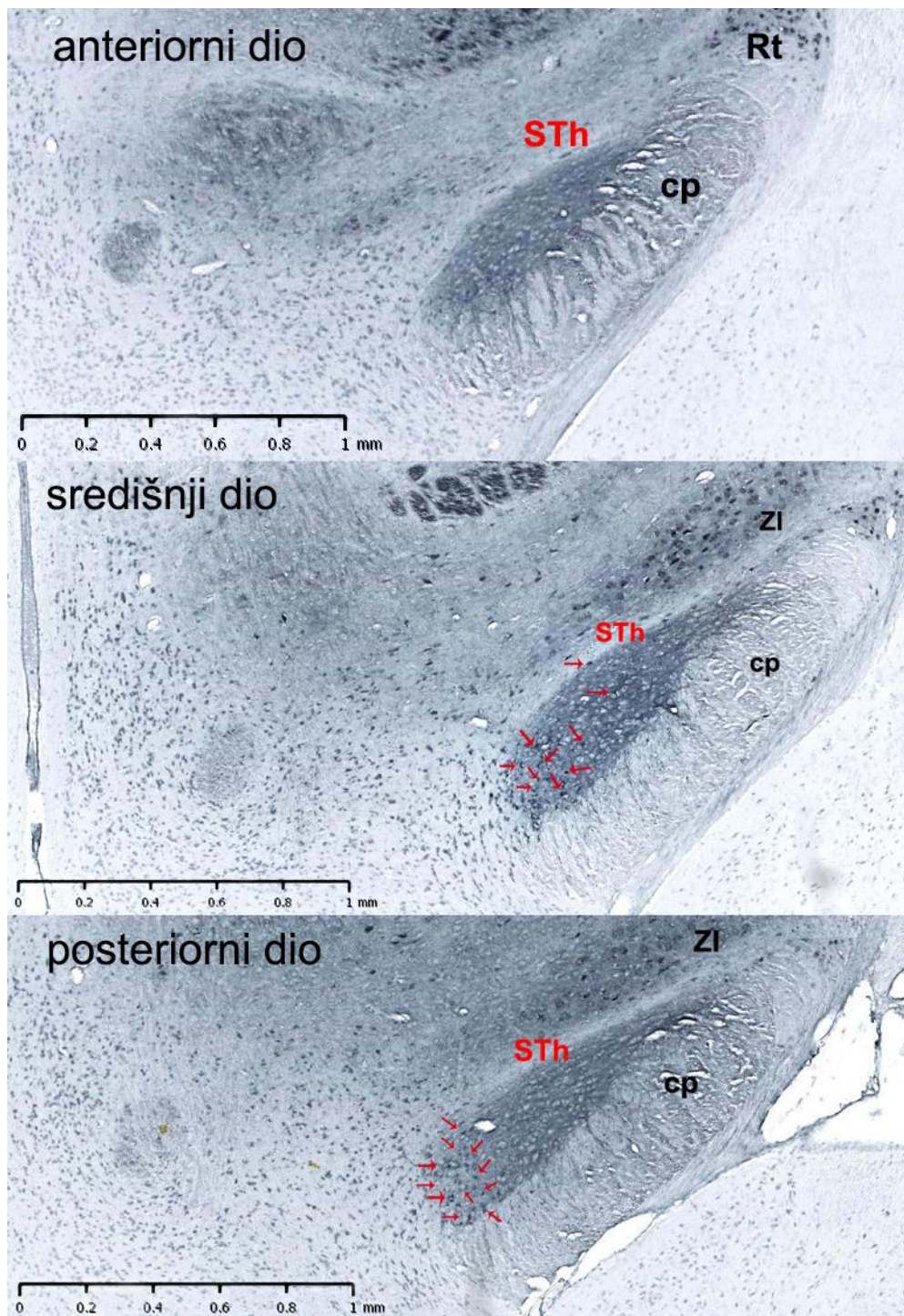
4.1.2. Ekspresija proteina parvalbumin

Općenito je cijela subtalamička jezgra pozitivna na parvalbumin, a posebno se tamno obojio neuropil (područja prožeta dendritima i nemijeliniziranim aksonima, bez soma stanica), zbog čega je malo teže razlučiti pozitivne stanice (obilježene crvenim strelicama, Slike 12 i 13).



Slika 12. Ekspresija parvalbumina (označena crvenim strelicama u STh) na uzorcima miša 1. STh, subtalamička jezgra; cp, cerebralni pedunkul; LH, lateralni hipotalamus. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.

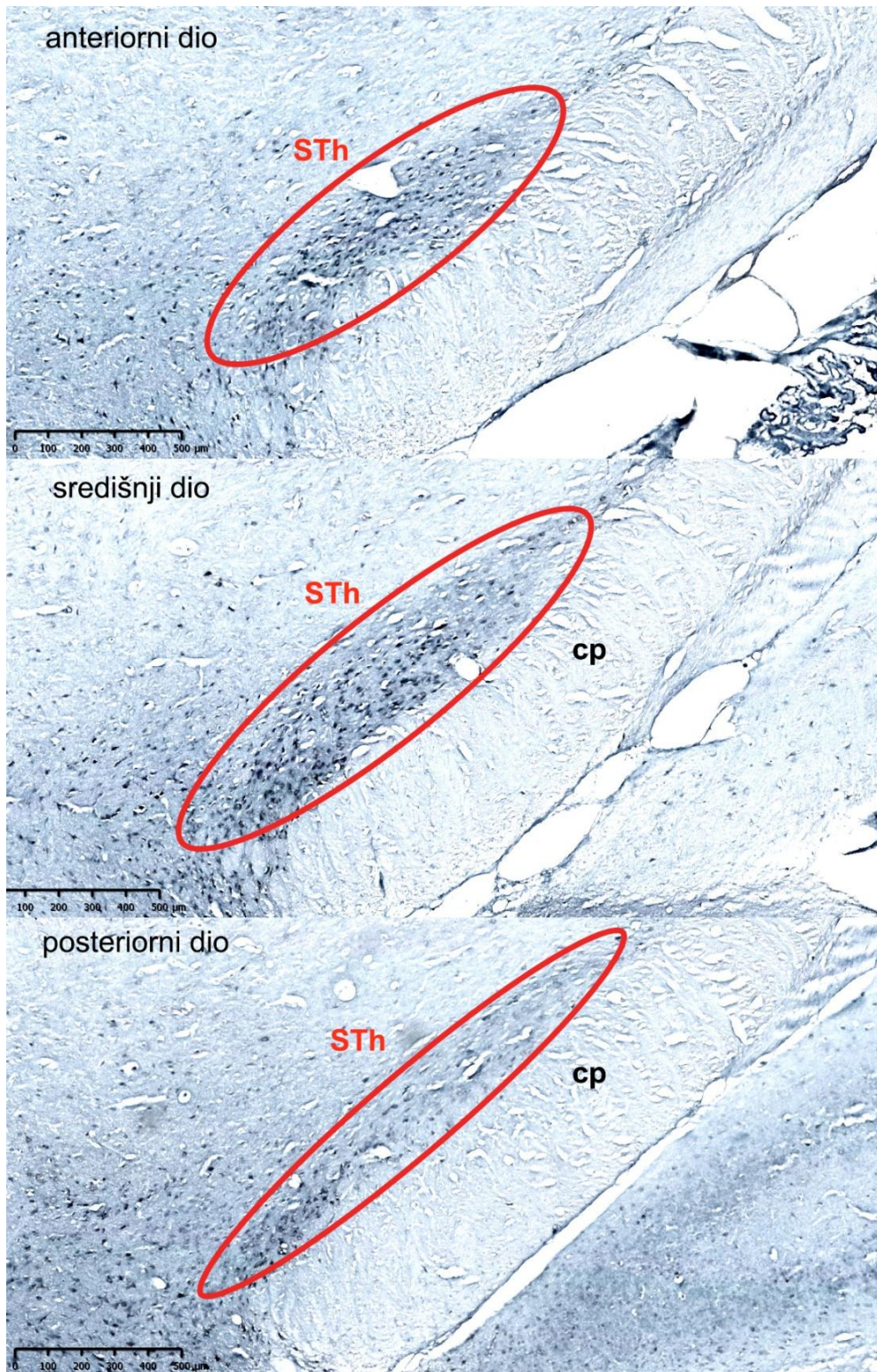
Na anteriornom kraju ima jako malo pozitivnih stanica i uglavnom su smještene dorzolateralno, dok ih u posteriornom dijelu jezgre ima više i smještene su ventromedijalno. (Slike 12 i 13)



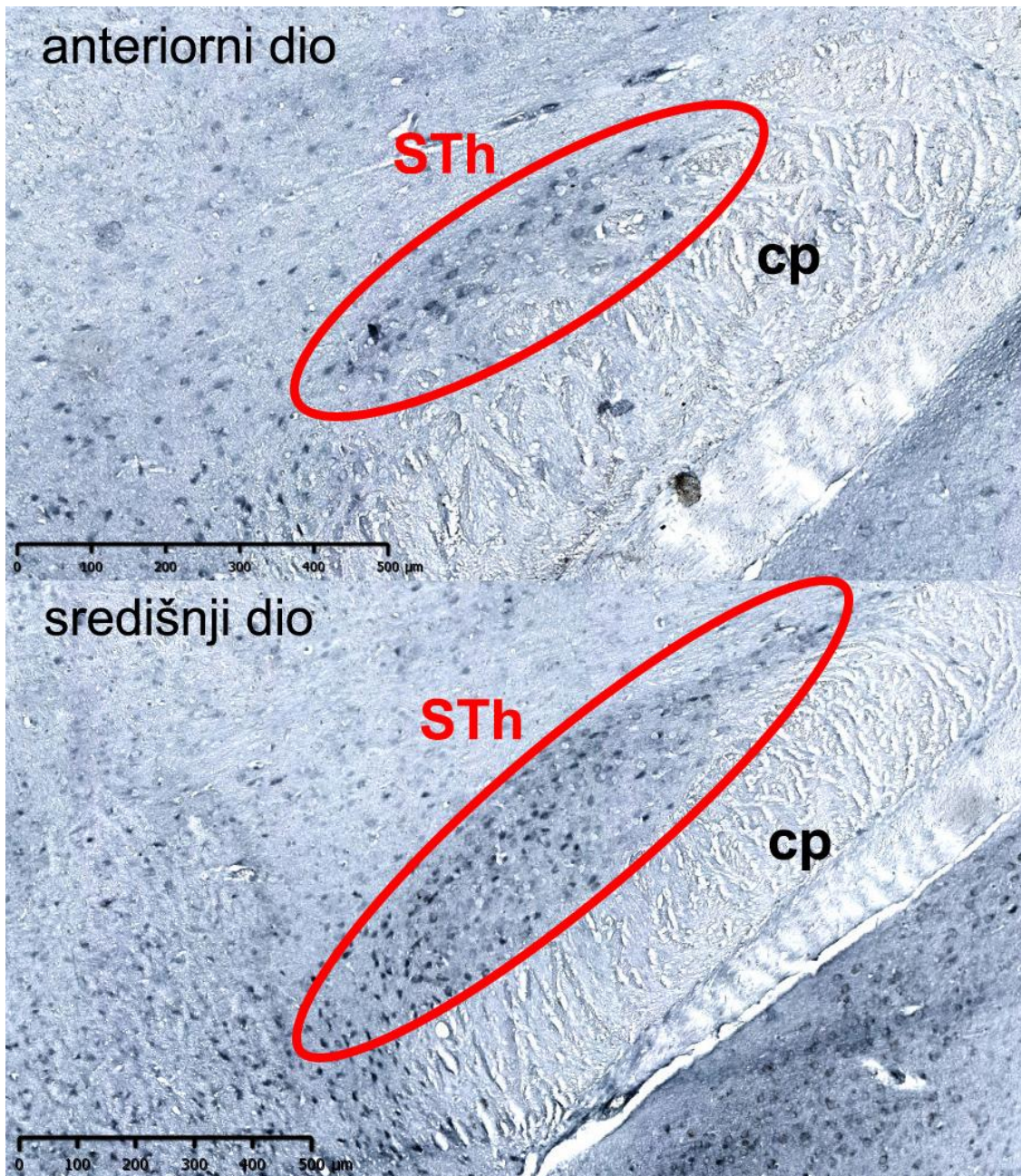
Slika 13. Ekspresija parvalbumina (označena crvenim strelicama u STh) na uzorcima miša 2. STh, subtalamička jezgra; cp, cerebralni pedunkul; ZI, zona incerta. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.

4.1.3. Ekspresija proteina nNOS

Subtalamička jezgra miša pozitivna je na nNOS, a najgušća populacija nNOS-pozitivnih stanica nalazi se u središnjem dijelu jezgre (Slike 14 i 15).



Slika 14. Ekspresija proteina nNOS na uzorcima miša 1. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.

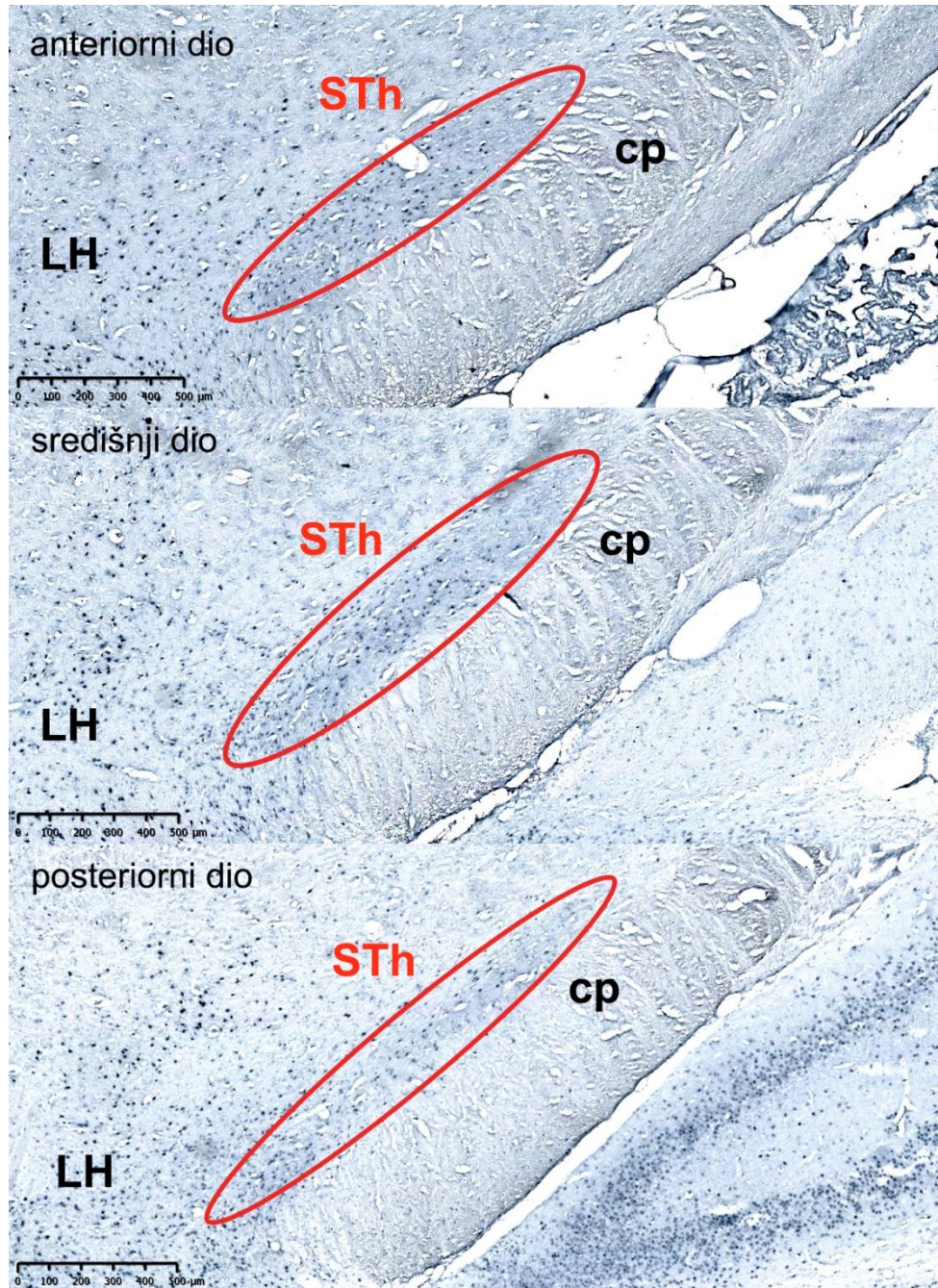


Slika 15. Ekspresija proteina nNOS na uzorcima miša 2. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.

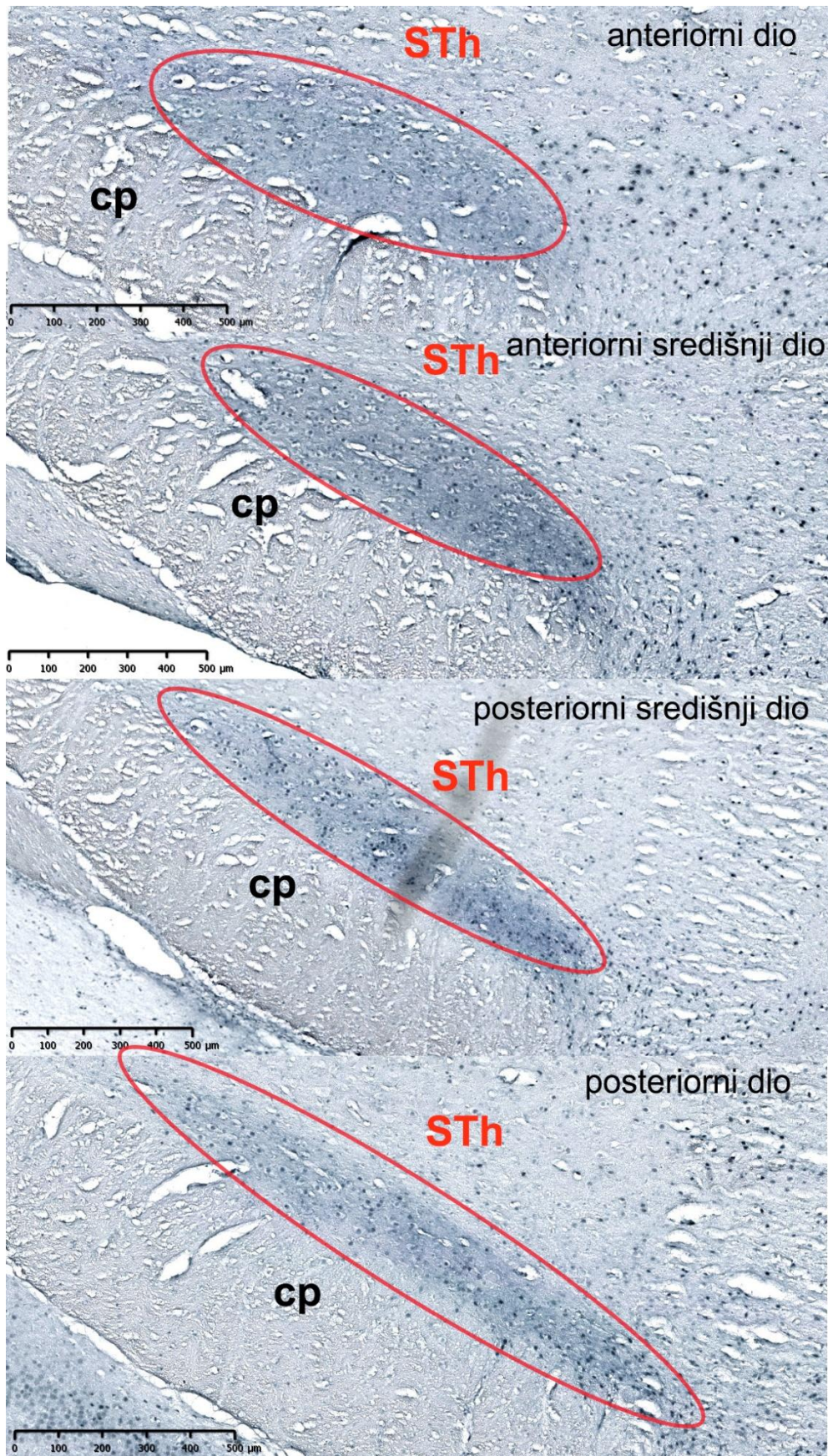
4.2. Rezultati dobiveni na tkivu štakora

4.2.1. Ekspresija proteina Nkx2.1

U subtalamičkoj jezgri odraslog štakora vide se pozitivno obojane jezgre stanica koje su relativno podjednako raspoređene u prostoru (Slike 16 i 17).



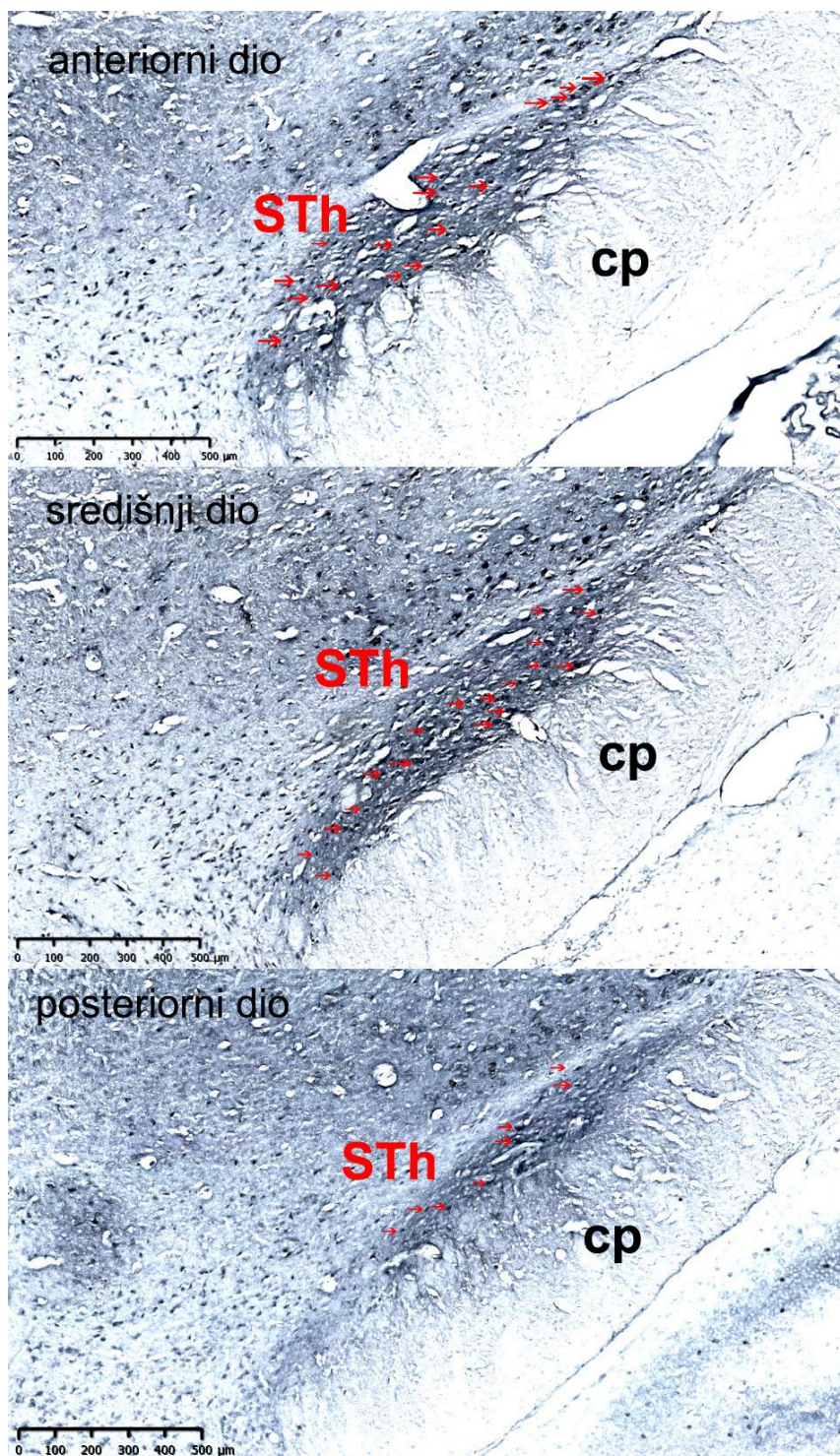
Slika 16. Ekspresija proteina Nkx2.1 na uzorcima štakora 1. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.



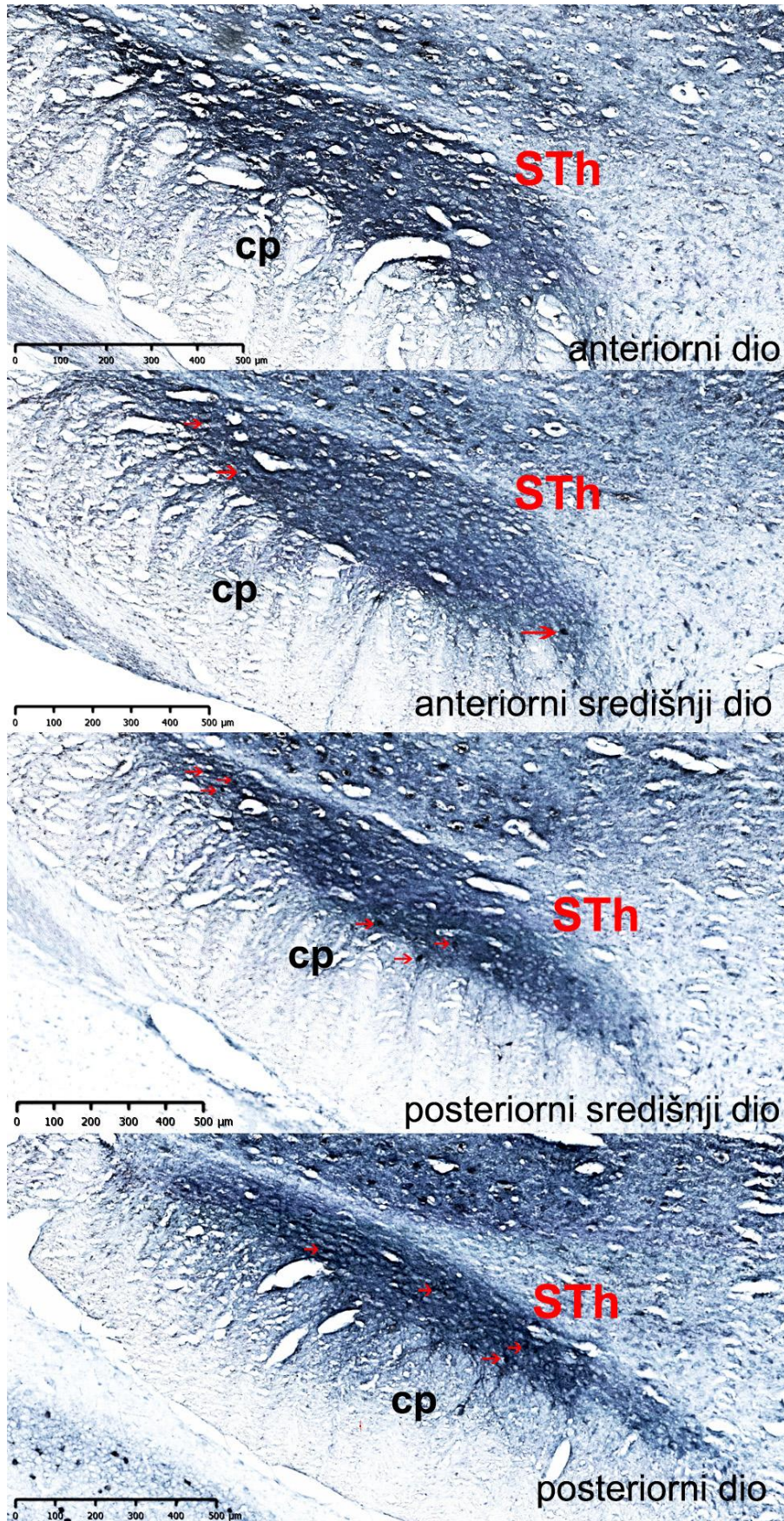
Slika 17. Ekspresija proteina Nkx2.1 u STh štakora 2. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; lateralno, lijevo; medijalno, desno.

4.2.2. Ekspresija proteina parvalbumina

Neuropil subtalamičke jezgre snažno je reaktivan na protutijelo anti-parvalbumin (Slike 18 i 19). U tamnom neuropilu vidljiva su tijela parvalbumin-pozitivnih stanica, kojih, ovisno o presjeku, u određenim ravninama nema, a u određenim ima malo ili više, no uglavnom su to anteriorni dijelovi jezgre.



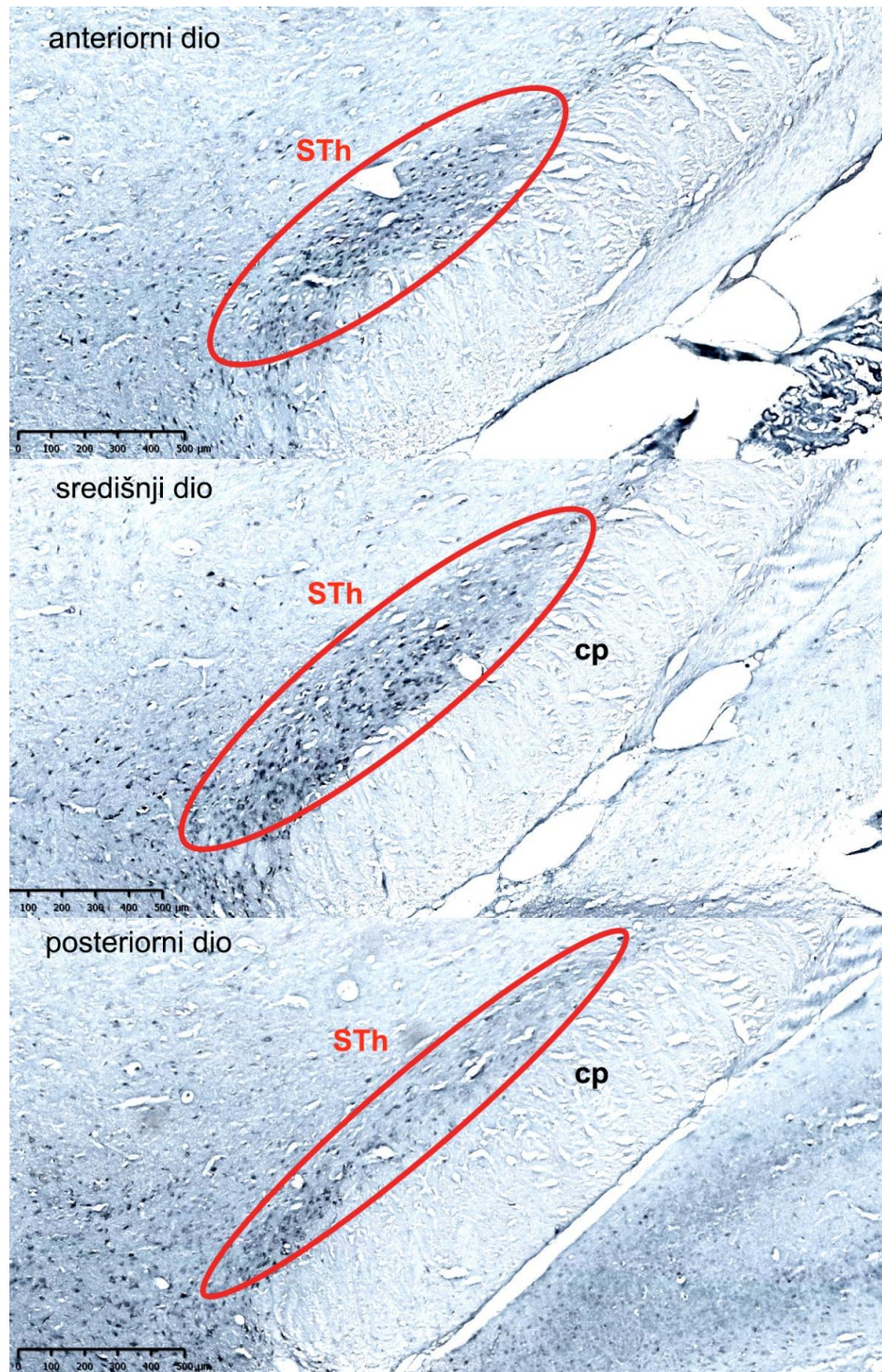
Slika 18. Ekspresija parvalbumina na uzorcima štakora 1. STh, subtalamička jezgra; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.



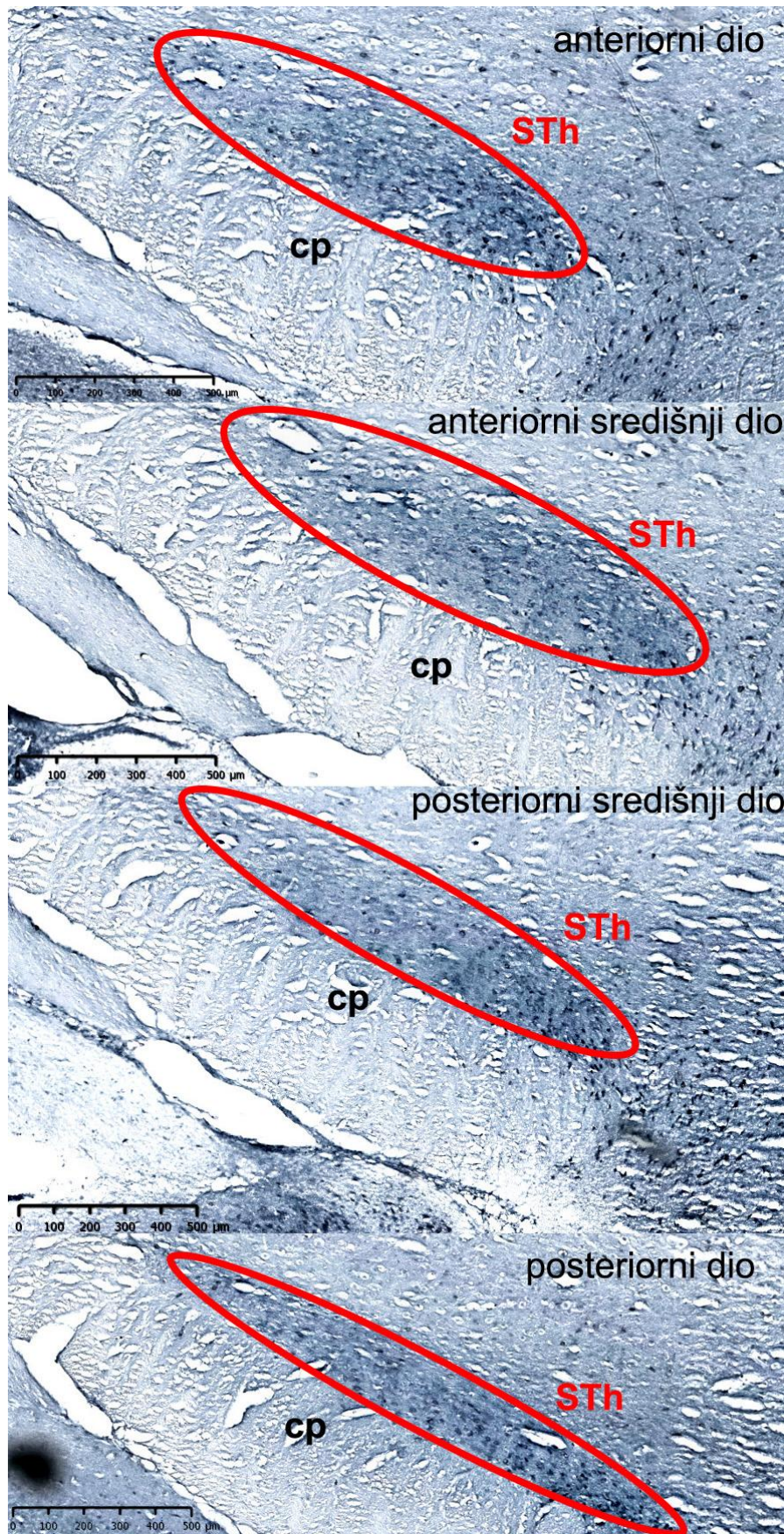
Slika 19. Ekspresija parvalbumina na uzorcima štakora 2. STh, subtalamička jezgra; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; lateralno, lijevo; medijalno, desno.

4.2.3. Ekspresija proteina nNOS

Stanice subtalamičke jezgre odraslog štakora pozitivne su i na nNOS. Od anteriornog prema posteriornom kraju jezgre, pozitivno obojena tijela neurona sve se više koncentriraju u ventromedijalnom dijelu, dok ih u dorzolateralnom kraju ima manje.



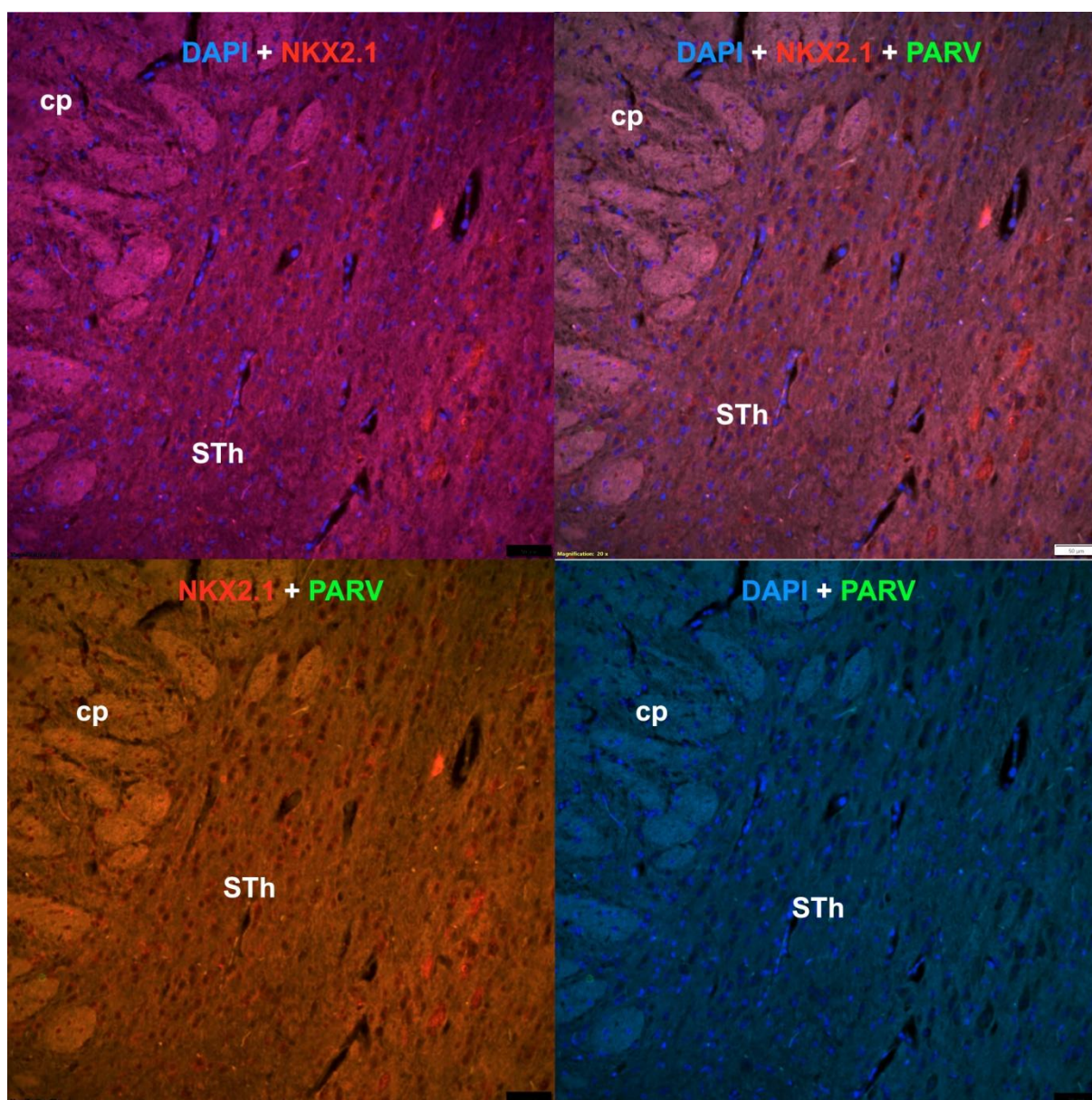
Slika 20. Ekspresija proteina nNOS na uzorcima štakora 1. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; medijalno, lijevo; lateralno, desno.



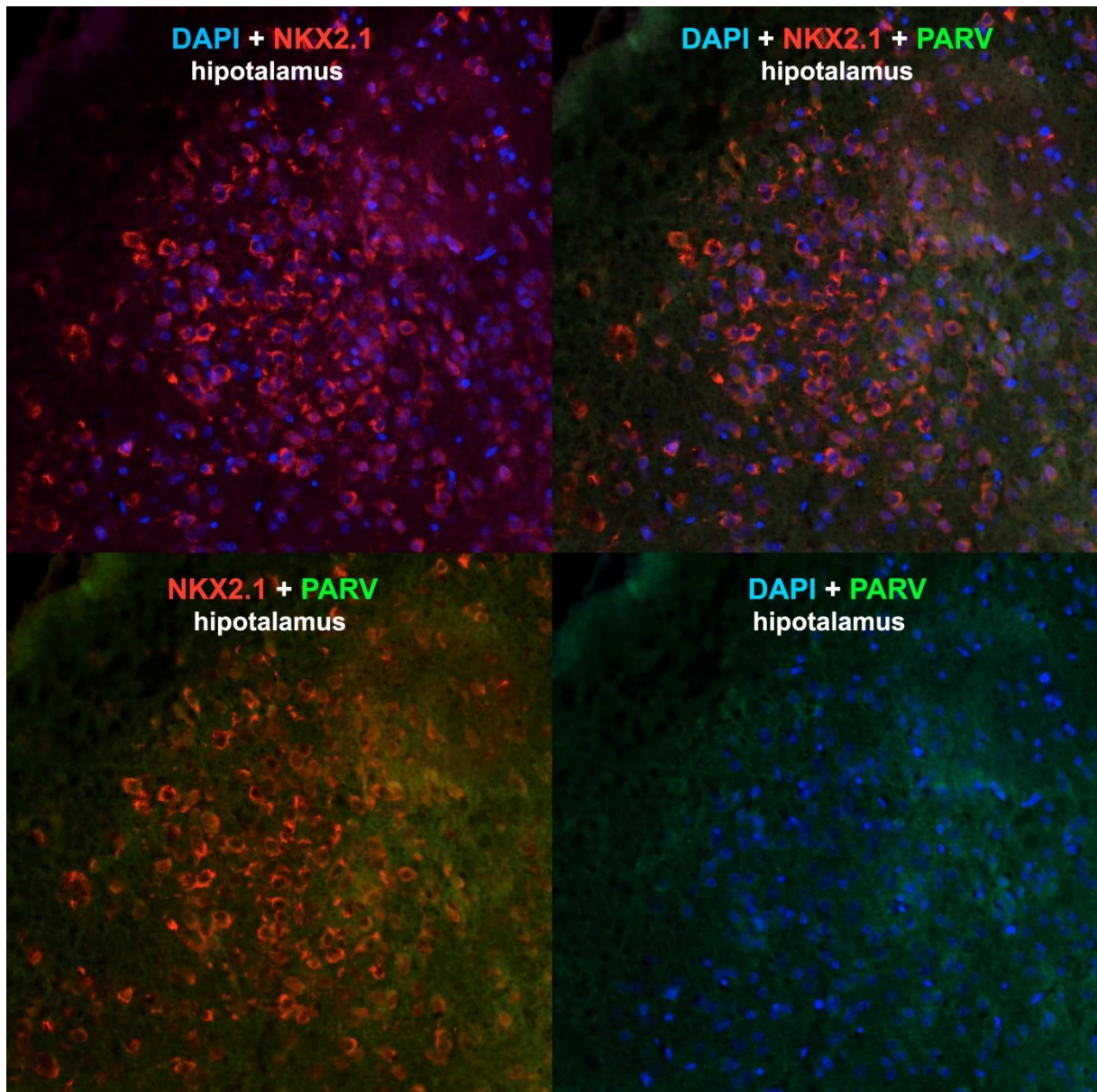
Slika 21. Ekspresija proteina nNOS na uzorcima štakora 2. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul. Dorzalno, gore; ventralno, dolje; lateralno, lijevo; medijalno, desno.

4.2.4. Imunofluorescencija s dvostrukim obilježavanjem

Rezultati imunofluorescencije pokazuju kako se protein Nkx2.1, inače transkripcijski faktor, nalazi u citoplazmi neurona, što se može vidjeti na slikama 22 (u subtalamičkoj jezgri) i 23 (u hipotalamusu) gdje je posebno jak crveni signal u citoplazmama stanica. Dokaz da se crveno obojenje odnosi na stanice je kolokalizacija s jezgrama obojanim DAPI-jem, što nije očekivani obrazac signala. Zeleni signal parvalbumina se ovdje ne vidi, no kako se vidjelo na imunohistokemijskim preparatima, parvalbumin-pozitivnih tijela stanica nema u svakoj ravni.

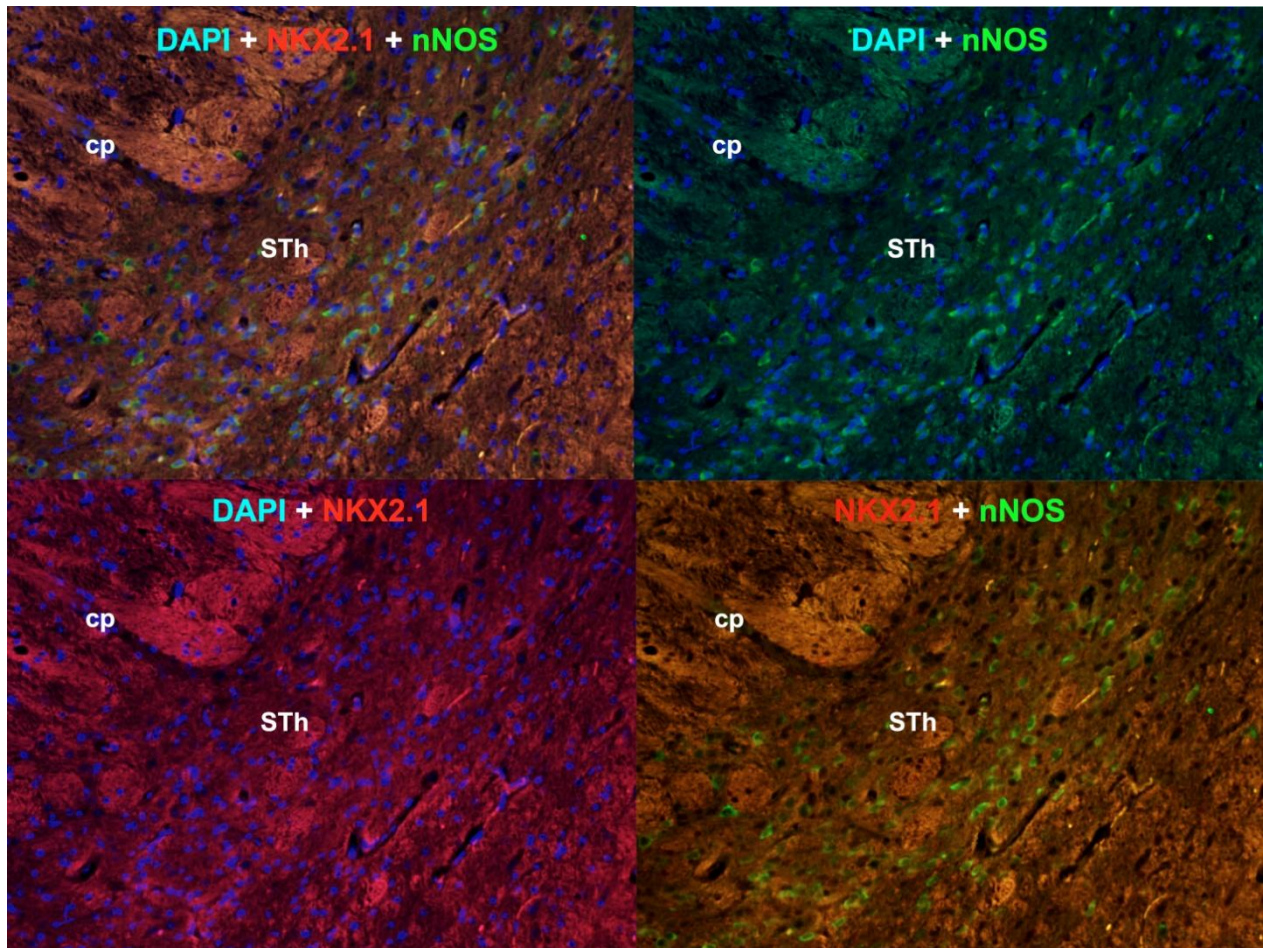


Slika 22. Kolokalizacija Nkx2.1 i parvalbumina u STh štakora s jezgrama obilježenim DAPI-jem. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul.



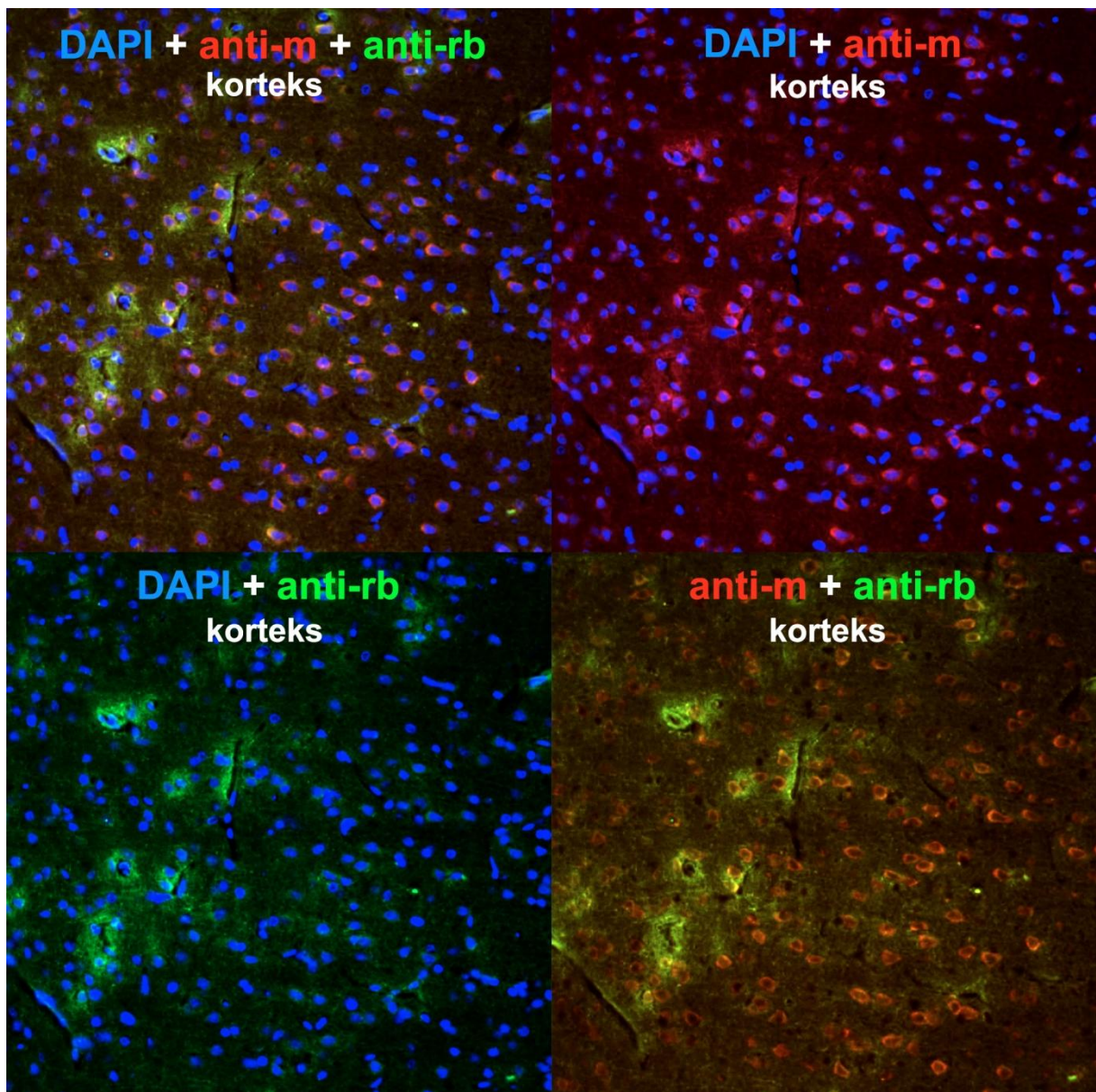
Slika 23. Kolokalizacija Nkx2.1 i parvalbumina u hipotalamusu štakora s jezgrama obilježenim DAPI-jem.

Zeleni signal protutijela za nNOS vidi se u citoplazmama stanica u subtalamičkoj jezgri (slika 24), što je donekle očekivano.



Slika 24. Kolokalizacija proteina Nkx2.1 i nNOS u STh štakora s jezgrama obilježenim DAPI-jem. STh, subtalamička jezgra, zaokružena crveno; cp, cerebralni pedunkul.

Ono što može objasniti crveni signal u citoplazmama stanica koji bi trebao odgovarati proteinu Nkx2.1 su preparati s negativnim kontrolama na kojima su uzorci inkubirani samo sa sekundarnim protutijelima (zeleno anti-rabbit i crveno anti-mouse). Na slici 25 možemo vidjeti jak crveni signal u citoplazmi većine stanica korteksa. Isto tako, na nekim stanicama vidi se i nNOS (zeleni) signal u citoplazmi.



Slika 25. Negativna kontrola sa sekundarnim protutijelima na uzorcima korteksa štakora.

Pozitivan signal u stanicama negativnih kontrola upućuje na činjenicu da sekundarna protutijela korištena u ovom istraživanju nisu specifična jer se s velikim afinitetom vežu za citoplazmu stanica. Zbog toga nijedan rezultat dobiven imunofluorescencijom gdje su korištena ova sekundarna protutijela ne možemo smatrati pozitivnim, jer ne možemo razlučiti koji je signal posljedica pozitivnog i specifičnog vezanja na primarno protutijelo, a koji je posljedica nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela.

4.3. Rezultati analize sekvenci miša i štakora za gen Nkx2.1

Tablica 2 prikazuje rezultate poravnanja različitih sekvenci Nkx2.1. Sekvence korištene u poravnanjima navedene su u prilogima na kraju ovog rada. Proteinske sekvence miša i štakora imaju 99.5% sličnosti. Genomske sekvence su dosta različite, odnosno imaju 55.5% sličnosti. Miš ima duži gen (6151 bp) s tri egzona dok štakor ima kraći gen (4391 bp) i dva egzona.

Miš ima i dva alternativna transkripta, jedan duži (koji ima tri egzona od kojih je jedan nekodirajući), a drugi kraći (koji ima dva egzona); imaju 79% sličnosti. (Informacije dostupne na:

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSMUSG00000001496;r=12:56531958-56536908;t=ENSMUST00000001536).

Štakor ima samo jedan transkript, dužinom sličan mišjem kraćem transkriptu, kojem je sličan 87.3%, za razliku od mišjeg dužeg transkripta kojem je sličan 70.4% (Dostupno na: http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Sequence?db=core;g=ENSRNOG00000008644;r=6:77418096-77421286;t=ENSRNOT00000011453).

Ako usporedimo samo CDS regije (kodirajuće sekvence) između dva transkripta miša dobijemo da su identične (100%), a štakoru su slične 97%, razlikuje ih par supstitucija nukleotida.

Transkript štakora nema 5' UTR, dok oba mišja transkripta imaju i 3' UTR i 5' UTR. 3' UTR regija miša je identična između dva transkripta (100%) dok je 5' UTR regija slična samo 5.7%. 3' UTR regija štakorskog transkripta je 81.6% slična 3' UTR regijama mišjih transkripta Nkx2.1.

Tablica 2. Rezultati poravnanja različnih sekvenci gena Nkx2.1.

Sekvenca 1	Sekvenca 2	Rezultat poravnanja
Proteinska <i>Mus musculus</i> P50220	Proteinska <i>Rattus norvegicus</i> G3V740	# Length: 372 # Identity: 369/372 (99.2%) # Similarity: 370/372 (99.5%) # Gaps: 0/372 (0.0%) # Score: 1942.0
Genomska <i>Mus musculus</i> ENSMUSG00000001496	Genomska <i>Rattus norvegicus</i> ENSRNOG00000008644	Length: 5109 Identity: 2835/5109 (55.5%) Similarity: 2835/5109 (55.5%) Gaps: 2072/5109 (40.6%) Score: 13015.5
Transkript 1 <i>Mus musculus</i> ENSMUST00000001536.8	Transkript 2 <i>Mus musculus</i> ENSMUST00000178477.8	Length: 2820 Identity: 2227/2820 (79.0%) Similarity: 2227/2820 (79.0%) Gaps: 589/2820 (20.9%) Score: 11049.5
Transkript 1 <i>Mus musculus</i> ENSMUST00000001536.8	Transkript <i>Rattus norvegicus</i> ENSRNOT00000011453.5	Length: 2930 Identity: 2062/2930 (70.4%) Similarity: 2062/2930 (70.4%) Gaps: 754/2930 (25.7%) Score: 12666.0
Transkript 2 <i>Mus musculus</i> ENSMUST00000178477.8	Transkript <i>Rattus norvegicus</i> ENSRNOT00000011453.5	Length: 2363 Identity: 2062/2363 (87.3%) Similarity: 2062/2363 (87.3%) Gaps: 187/2363 (7.9%) Score: 12666.0
CDS 1 <i>Mus musculus</i>	CDS 2 <i>Mus musculus</i>	Identity: 1119/1119 (100.0%) Similarity: 1119/1119 (100.0%) Gaps: 0/1119 (0.0%) Score: 11163.0
CDS <i>Mus musculus</i>	CDS <i>Rattus norvegicus</i>	Length: 1119 Identity: 1084/1119 (96.9%) Similarity: 1086/1119 (97.1%) Gaps: 0/1119 (0.0%) Score: 10818.0
5' UTR 1 <i>Mus musculus</i>	5' UTR 2 <i>Mus musculus</i>	Length: 613 Identity: 35/613 (5.7%) Similarity: 35/613 (5.7%) Gaps: 567/613 (92.5%) Score: 167.5
3' UTR 1 <i>Mus musculus</i>	3' UTR 2 <i>Mus musculus</i>	Length: 1077 Identity: 1077/1077 (100.0%) Similarity: 1077/1077 (100.0%) Gaps: 0/1077 (0.0%) Score: 6440.0
3' UTR <i>Mus musculus</i>	3' UTR <i>Rattus norvegicus</i>	Length: 1198 Identity: 978/1198 (81.6%) Similarity: 978/1198 (81.6%) Gaps: 141/1198 (11.8%) Score: 5594.0

Za predviđanje vezanja RNA-vezujućih proteina na UTR regije mRNA korišten je alat RBPmap, s izabranom opcijom pretraživanja „high stringency“ (gdje je značajna p-vrijednost < 0.001 a suboptimalna p-vrijednost < 0.01), što znači da sekvence moraju točno odgovarati poznatim motivima vezanja proteina. Rezultati su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Rezultati predviđenih vezanja proteina na UTR regije mRNA za Nkx2.1

Proteini koji se vežu samo na 3' UTR štakora	Proteini koji se vežu samo na UTR regije miša (3' + 5')	Proteini koji se vežu samo na 3' UTR regije miša	Proteini koji se vežu samo na 5' regije miša
ANKHD1	CPEB4	FXR1	PPRC1
HNRNPF	FUS	IGF2BP2	RBM4
HNRNPH2	FXR1	PABPC1	RBM42
HNRNPU	HNRPLL	PABPC3	RBM46
RBM24	IGF2BP2	RBM45	ZC3H10
RBM28	PABPC1		
RBM38	PABPC3		
SFPQ	PABPC4		
SNRPA	PPRC1		
TUT1	RBM4		
	RBM42		
	RBM45		
	RBM46		
	RBM5		
	RBM8A		
	SART3		
	ZC3H10		

5. RASPRAVA

Subtalamička jezgra odraslog miša je negativna na Nkx2.1, što je iznenađujuće, pogotovo kada se usporedi s podacima iz Allen Brain Atlasa ekspresije mRNA u mišjem mozgu, gdje se jasno vidi da u subtalamičkoj jezgri odraslog miša postoji ekspresija mRNA za Nkx2.1 (<https://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=74988460>). To može značiti da se konačna ekspresija proteina Nkx2.1 zapravo regulira na razini translacije, budući da rezultati ovog istraživanja upućuju na to da proteina na kraju nema. U Allen Brain Atlasu su rezultati dobiveni na istom soju miša (C57BL/6), pa tu ne bi trebalo biti nikakve razlike, no njihovi miševi su bili stari 56 dana, dok su u ovom istraživanju miševi bili stari 3,5 mjeseca (oko 105 dana), što je dvostruko starija dob, pa je druga mogućnost ta da se u nekoj dobi miša, gen *Nkx2.1* utiša i njegova ekspresija prestaje. To se treba dalje istražiti na način da se, primjerice, napravi *in situ* hibridizacija za mRNA Nkx2.1 u dobi miša od 3,5 mjeseci, da se utvrdi postoji li tada transkripcija dok nema translacije, ili je cijeli gen utišan. Dvije studije su analizirale distribuciju ekspresije mRNA i proteina Nkx2.1 u telencefalonu fetalnog i odraslog miša i nisu navele da postoji ekspresija i u STh, što može značiti da je nema, ali može značiti samo to da je nisu ni analizirali pošto je to struktura diencefalona (Xu i sur. 2008, Magno i sur. 2009).

Ovdje opet želim skrenuti pažnju na problem kortikocentrizma u neuroznanosti gdje se u fokus istraživanja često stavlja gotovo isključivo telencephalon, prednji mozak, gdje se nalazi korteks, zbog čega je teško pronaći literaturne podatke o ostalim „inferiornim“ strukturama. Ako se subkortikalne strukture i spomenu, to su u pravilu strukture prednjeg mozga, dok ostali dijelovi mozga ostaju zanemareni. Parvizi (2009) je pretraživanjem literature u kognitivnoj neuroznanosti ustanovio da se od istraživanja u kojima su se subkortikalne strukture mogle staviti u fokus istraživanja, zaista stavile u fokus u 9 do 14% istraživanja. Polovica članaka je izvijestila rezultate dobivene na subkortikalnim strukturama, koji su bili uključeni u raspravu u četvrtinu članaka, tog kod druge četvrtine nisu.

S druge strane, za razliku od miša, subtalamička jezgra odraslog štakora je pozitivna na protein Nkx2.1. Zbog te iznenađujuće razlike, odlučila sam usporediti sekvence miša i štakora za gene, transkripte, kodirajuće i nekodirajuće regije Nkx2.1, da utvrdim koliko se razlikuju između dvije vrste i može li to biti razlog različite ekspresije proteina. Sekvence su se najviše razlikovale u nekodirajućim, regulatornim regijama, a posebno u netranslatiranim krajevima (UTR).

UTR regije su mjesta važna za posttranskripcijsku regulaciju translacije mRNA u protein jer se na njih vežu proteini koji reguliraju translaciju (Wilkie i sur. 2003). Zbog toga sam napravila predviđanje mjesta vezanja mRNA-vezujućih proteina na tim regijama. Rezultat je takav da postoje setovi proteina koji se potencijalno mogu vezati isključivo na UTR regiju transkripta mRNA za Nkx2.1 štakora, ili isključivo na 3' UTR regiju transkripta miša, ili isključivo na 5' UTR regiju miša. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se eksperimentalno utvrdilo koji od tih proteina i kako regulira translaciju, vežu li se zaista na predviđena mjesta, te naposljetku eksprimiraju li se ti sami proteini uopće u subtalamičkoj jezgri.

Treća mogućost zbog koje postoji razlika u ekspresiji proteina Nkx2.1 u STh miša i štakora je da zapravo kod štakora postoji populacija neurona u subtalamičkoj jezgri koja kod miša nedostaje, primjerice, interneuroni koji migriraju iz medijalnog ganglijskog brežuljka. Prema literaturi, interneurone u subtalamičkoj jezgri posjeduju primati, a prema morfologiji neurona pretpostavlja se da ih mogu posjedovati i svinja (*Sus scrofa domestica*) i mačka (*Felis catus domestica*), dok ih kod glodavaca navodno nema (Marani i sur. 2008). Moguće je, ali malo vjerojatno, da se taj evolucijski skok dogodio i unutar porodice Muridae, te da zato neke vrste nemaju interneurone (kao miš) a druge imaju (kao štakor). Muridae je porodica koja sadržava jednu trećinu ukupno svih vrsta sisavaca čineći ju najvećom i najraznolikijom porodicom. Unutar te porodice, evolucijske linije miša i štakora odvojile su se prije 10 do 12 milijuna godina (Steppan i sur. 2004).

Prema filogenetskom stablu placentalnih sisavaca (Murphy i sur. 2001), glodavci (klad Glires) i primati (klad Euarchonta) zajedno pripadaju evolucijskoj liniji Euarchontoglires, dok svinje (Cetartiodactyla) i mačke (Carnivora) pripadaju evolucijskoj liniji Laurasiatheria. Zajedno te dvije linije čine skupinu Boreoeutheria, iliti placentalnih sisavaca. Ako se vodimo načelom parsimonije gdje je najmanji mogući broj evolucijskih promjena najvjerojatniji, onda su se interneuroni u STh pojavili najkasnije odvajanjem linije Boreoeutheria od ostalih sisavaca prije ~105 milijuna godina, a evolucijska linija miševa (ili glodavaca općenito, ovisno o tome imaju li oni uopće interneurone u STh) je kasnije izgubila to svojstvo.

Da bi se utvrdilo pristustvo interneurona, potrebno je kao prvo detektirati jesu li to uopće GABA-ergički neuroni, za što bi se trebala detektirati prisutnost markera za GABA-u, npr. glutamat dekarboksilaza (GAD) ili GABA transporter (VGAT). Neke studije su to već pokušavale, ali rezultati su nejasni - nađena mala količina mRNA za GAD kod STh štakora, ali ne značajno velika (Oertel i Mugnaini 1984, Mugnaini i Oertel 1985, Yasumi i sur. 1997). Problem kod detekcije GABA-ergičkih interneurona je taj što su, kao prvo, interneuroni dvostruko manji od projekcijskih neurona, kao drugo, općenito ih je znatno manje što se tiče brojnosti (Levesque i Parent 2005), a kao treće, markeri za GABA-u su proteini koji se nalaze u sinaptičkim završecima – dakle, imunohistokemijski ne bojaju tijela neurona kao parvalbumin niti jezgre kao Nkx2.1, i teško je razlučiti pozitivan signal od pozadinskog obojenja. Osim toga, pozitivan signal ne mora biti od interneurona STh nego od završetka aksona GABA-ergičkog projekcijskog neurona iz GPe, a na taj ih se način ne može razlikovati. Zato se učestalije rade eksperimenti gdje se detektira mRNA za te markere, s pretpostavkom da će količina mRNA biti veća, i da će signal biti zadržan oko jezgre, te će se moći detektirati tijela neurona.

Da bi se utvrdila migracija neurona iz medijalnog ganglijskog brežuljka, potrebno je napraviti studiju praćenja sudbine neurona (eng. *fate mapping*), odnosno *in vivo* pratiti migraciju obilježenih neurona u fetalnoj dobi. Isto tako je važno naglasiti da ako postoji takva migracija, to ne mora nužno značiti da su to GABA-ergički interneuroni, već to mogu biti i projekcijski neuroni koji također mogu migrirati iz MGE, kao što se to događa kod ostalih bazalnih ganglija - npr. *striatuma* (Marin 2000) i *globus pallidusa* (Nobrega-Pereira 2010). Njihovi projekcijski neuroni porijekla iz MGE pozitivni su na Nkx2.1 i parvalbumin, što je razlog zbog kojeg sam željela utvrditi kolokalizaciju Nkx2.1 s parvalbuminom. Pretpostavljala sam da je lakše detektirati projekcijske neurone (kojih je više i veći su) od interneurona za koje je potrebno raditi posebnu *in situ* hibridizaciju i RNAscope za kolokalizaciju mRNA s proteinima.

Zbog eksperimenta imunofluorescencije koji je dao lažno pozitivne rezultate, nisam uspjela fenotipizirati stanice pozitivne na Nkx2.1. Potrebno je ponoviti eksperiment s novim sekundarnim protutijelima. Pretpostavljam da je uzrok nespecifičnosti korištenih protutijela činjenica da možda predugo stoje, pa su se stvorili agregati proteina koji se, kada dođu u kontakt s tkivom, afinitetno vežu za proteine u citoplazmi stanice. Druga mogućnost je da su sekundarna protutijela kontaminirana nekim proteinima, moguće i nekim primarnim protutijelom koje se veže na neki citoplazmatski protein.

Rezultati pokazuju da Nkx2.1 nije dobar kao marker medijalnog ganglijskog brežuljka u diencefalonu budući da se također eksprimira u hipotalamusu. Možda je dobar marker MGE kad ga se gleda u korteksu, ali zapravo je on općeniti marker bazalne ploče (sloja neuralne cijevi u embrionalnom razvoju nakon što se ona podijeli na krovnu, alarnu, bazalnu i podnu), jer se iz bazalne ploče dalje razvijaju bazalni telencefalon (kojemu pripada MGE) i hipotalamus (Watson i sur. 2012). Zbog toga ništa drugo o razvojnom porijeklu subtalamičke jezgre zapravo ne možemo zaključiti na temelju ekspresije proteina Nkx2.1 u odraslom mozgu, osim da potječe od bazalne ploče. Odnosno, ovim rezultatima ne možemo podržati niti opovrgnuti niti jednu konkretnu teoriju o njezinom porijeklu.

Subtalamička jezgra i miša i štakora je pozitivna na parvalbumin, kao što je bilo i očekivano prema podacima iz literature (Marani i sur. 2008). Neuropil je posebno jako obojen zbog toga što subtalamička jezgra prima aksone iz *globus pallidusa* čiji su projekcijski neuroni parvalbumin-pozitivni (Nobrega-Pereira 2010). Tijela parvalbumin-pozitivnih neurona u samoj subtalamičkoj jezgri postoje, a ponekad su teško uočljivi zbog toga što je cijeli neuropil oko njih tamno obojen.

Što se tiče ekspresije proteina nNOS, subtalamička jezgra obje vrste ima pozitivnih neurona. Prema literaturi 90% neurona čovjeka je pozitivno na protein nNOS (Santos-Lobato i sur. 2016). Budući da sam radila samo kvalitativnu studiju, nisam u mogućnosti konkretnije usporediti udjele nNOS neurona. Za to je potrebno napraviti kvantitativnu studiju na način da se kolokalizira nNOS sa markerom neurona NeuN kako bi se izbrojio udio nNOS neurona u odnosu na ukupan broj neurona.

Na kraju, važno je spomenuti studiju koja je pokazala kako se ekspresija nNOS proteina u određenim dijelovima moždane kore razlikuje između čovjeka i miša, te je ta razlika regulirana na razini translacije na način da kod miša nedostaju određene regije u sekvencama mRNA za koje se treba vezati protein FMRP koji aktivira translaciju u protein. (Kwan i sur. 2012). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da postoji mogućnost da je sličan mehanizam razlog zbog kojega se razlikuje ekspresija odnosno translacija proteina Nkx2.1 između miša i štakora u subtalamičkoj jezgri.

6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju analizirana je ekspresija markera Nkx2.1, parvalbumin i nNOS u svrhu utvrđivanja njihove prostorne ekspresije i kolokalizacije u subtalamičkoj jezgri miša i štakora. Od zadanih ciljeva, utvrđeni su obrasci ekspresije proteina Nkx2.1, parvalbumina i nNOS u subtalamičkoj jezgri odraslog miša i štakora, - no zbog nespecifičnosti sekundarnih protutijela nije definitivno utvrđena njihova kolokalizacija. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da postoji prostorna razlika u ekspresiji analiziranih markera. Također, uočena je i razlika u ekspresiji markera Nkx2.1 između miša i štakora, što do sada nije opisano u literaturi. Dva najizglednija razloga za ovakve rezultate su da se s dobi smanjuje ekspresija Nkx2.1 markera pa kod starijih miševa se ne uočava u odnosu na starije štakore i da je miš tijekom evolucije izgubio neurone koji eksprimiraju Nkx2.1. Interpretacija dobivenih rezultata dodatno je otežana činjenicom da je većina istraživanja koja se bavila ekspresijom Nkx2.1 prvenstveno usmjerena na moždanu koru, tj. kortikocentrična. Zbog toga se mnogi podaci ne mogu se izravno aplicirati na subkortikalne strukture (npr. da je Nkx2.1 marker interneurona). Za potpuno razrješenje dvojbi o evolucijskoj važnosti ekspresije Nkx2.1 i njegovom značaju u razvoju STh neurona potrebno je provesti dodatna istraživanja, prvenstveno s boljim sekundarnim protutijelima za imunofluorescenciju.

7. LITERATURA

Benabid AL, Polak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1989). Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* **50**: 344-346.

Benarroch EE (2008). Subthalamic nucleus and its connections. *Neurology* **70**: 1991-1995.

Benazzouz A, Gao DM, Ni ZG, Piallat B, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL (2000). Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. *Neuroscience* **99**: 289-295.

Cha CI, Sohn SG, Chung YH, Shin C, Baik SH (2000). Region specific changes of NOS-IR cells in the basal ganglia of the aged rat. *Brain. Res.* **854**: 239-244.

Eve DJ, Nisbet AP, Kingsburry AE, Hewson EL, Daniel SE, Lees AJ, Marsed CD, Forster OJ (1998). Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **63**: 62-71.

Gage GJ, Kipke DR, Shain W (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp* **65**: 3564.

Gilbert MS (1935). The early development of the human diencephalon. *J Comp Neurol.* **62**: 81-115.

Grillner S, Robertson B (2016). The Basal Ganglia Over 500 Million Years. *Current Biology* **26**: 1088-1100.

Grillner S, Robertson B, Stephenson-Jones M (2013). The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action selection. *J. Physiol.* **591**: 5425-5431.

Herrick CJ (1910). The morphology of the forebrain in amphibia and reptili. *J Comp Neurol.* **20**: 413-547.

Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, Parton A, Armean IM, Trevanion SJ, Flicek P, Cunningham F (2018). Ensembl variation resources, Database Volume 2018.

Judaš M, Kostović I (1997). Temelji neuroznanosti. MD, Zagreb.

- Kahle W (1956). Zur Entwicklung des menschlichen Zwischenhirnes. Studien über Matrixphasen und die örtlichen Reifungs-unterschiede im embryonalen menschlichen Gehirn. II. *Mittlung.Dtsch Z Nervenheilkd.* **175**: 259-318.
- Kee N, Volakakis N, Kirkeby A, Dahl L, Stolvall H, Nolbrant S, Lahti L, Bjorklund AK, Gillberg L, Joodmardi R, Sandberg R, Parmar M, Perlmann T (2017). Single-Cell Analysis Reveals a Close Relationship between Differentiating Dopamine and Subthalamic Nucleus Neuronal Lineages. *Cell Stem Cell* **20**: 29-40.
- Keuken MC, Uylings HBM, Geyer S, Schaefer A, Turner R, Forstmann BU (2012). Are there three subdivisions in the primate subthalamic nucleus? *Frontiers in Neuroanatomy* **6**: 14.
- Keyser A (1972). The development of the diencephalon of the Chinese hamster. Thesis, Nijmegen.
- Kwan KY, Lam MMS, Johnson MB, Dube U, Shim S, Rašin MR, Sousa AMM, Fertuzinhos S, Chen JG, Arellano JI, Chan DW, Pletikos M, Vasung L, Rowitch DH, Huang EJ, Schwartz ML, Willemsen R, Oostra BA, Rakić P, Heffer M, Kostović I, Judaš M, Šestan N (2012). Species-Dependent Posttranscriptional Regulation of NOS1 by FMRP in the Developing Cerebral Cortex. *Cell* **149**: 899-911.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009). Parkinson's disease. *Lancet* **373**: 2055-66.
- Letinic K, Rakic P (2001). Telencephalic origin of human thalamic GABAergic neurons. *Nature Neuroscience* **4**: 931-936.
- Levesque JC, Parent A (2005). GABAergic Interneurons in Human Subthalamic Nucleus. *Movement Disorders* **20**: 574-584.
- Lim L, Mi D, Llorca A, Marin O (2018). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* **100**: 294-313.
- Madeira F, Park YM, Lee J, et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* **47**: 636-641.
- Magno L, Catanzariti V, Nitsch R, Krude H, Naumann T (2009). Ongoing expression of Nkx2.1 in the postnatal mouse forebrain: Potential for understanding NKX2.1 haploinsufficiency in humans? *Brain Research* **1304**: 164-186.

- Marani E, Heida T, Lakke E, Usunoff K (2008): The Subthalamic Nucleus Part I: Development, Cytology, Topography and Connections. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Marchand R (1987). Histogenesis of the subthalamic nucleus. *Neuroscience* **21**: 183–195.
- Marin O, Anderson SA, Rubenstein JLR (2000). Origin and Molecular Specification of Striatal Interneurons. *The Journal of Neuroscience* **20**: 6063-6076.
- Marin O, Rubenstein JLR (2001). A Long, Remarkable Journey: Tangential Migration in the Telencephalon. *Nature Reviews Neuroscience* **2**: 780-790.
- Medina L, Abellan A (2009). Development and evolution of the pallium. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**: 698-711.
- Mugnaini E, Oertel WH. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: Bjorklund A, Hokfelt T (1985). Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier, Amsterdam.
- Müller F, O’Rahilly R (1988). The development of the human brain, including the longitudinal zoning in the diencephalons at stage 15. *Anat Embryol (Berl)* **179**: 55–71.
- Müller F, O’Rahilly R (1990). The human brain at stages 18–20, including the choroids plexuses and the amygdaloid and septal nuclei. *Anat Embryol (Berl)* **182**: 285–306.
- Murphy WJ, Eizirik E, O’Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, Jong WW, Springer MS (2001). Resolution of the Early Placental Mammal Radiation Using Bayesian Phylogenetics. *Science* **294**: 2348-2351.
- Nisbet AP, Forster OJ, Kingsburry A, Lees Aj, Marsden CD (1994). Nitric oxide synthase mRNA expression in human subthalamic nucleus, striatum and globus pallidus: implications for basal ganglia function. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **22**: 329-332.
- Nobrega-Pereira S, Gelman D, Bartolini G, Pla R, Pierani A, Marin O (2010). Origin and Molecular Specification of Globus Pallidus Neurons. *The Journal of Neuroscience* **30**: 2824-2834.
- Nunta-Aree S, Ohata K, Soares SB, Haque M, Takami T, Inoue Y (2001). The morphological development of human basal ganglia. *Congenit Anom (Kyoto)* **41**: 177–86.
- Oertel WH, Mugnaini E (1984). Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat

- basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett.* **47**: 233-238.
- Papez JW (1940). The embryonic development of the hypothalamic area in mammals. *Res. Pub& Ass. Res. neru. ment Dis.* **20**: 31-51.
- Parvizi J (2009). Corticocentric myopia: old bias in new cognitive sciences. *Trends in Cognitive Sciences* **13**: 354-359.
- Paxinos G, Franklin K (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second edition. Academic Press, Elsevier.
- Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sixth edition. Academic Press, Elsevier.
- Paz I, Kosti I, Ares M Jr, Cline M, Mandel-Gutfreund Y (2014). RBPmap: a web server for mapping binding sites of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **2014**.
- Philips ST, Albin RL, Martin DM (2005). Genetics of subthalamic nucleus in development and disease. *Experimental Neurology* **195**:320-330.
- Puelles L (2001). Thoughts on the development, structure and evolution of the mammalian and avian telencephalic pallium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **356**: 1583–1598.
- Purves D (2004). *Neuroscience*, Third edition. Sinauer Associates, Inc.
- Richter C. Uber die Entwicklung des Globus pallidus und des Corpus subthalamicum beim Menschen; U Hassler R, Stephan H (1966). Evolution of the forebrain. Stuttgart, Thieme. 285-295.
- Richter E (1965). *Die Entwicklung des Globus Pallidus und des Corpus Subthalamicum*. Springer, Berlin.
- Santos-Lobato BLD, Del-Bel E, Pittella JEH, Tumas V (2016). Cytoarchitecture of nitroergic neurons in the human striatum and subthalamic nucleus. *Brain Research Bulletin* **124**: 129-135.
- Steppan SJ, Adkins RM, Anderson J (2004). Phylogeny and Divergence-Date Estimates of Rapid Radiations in Muroid Rodents Based on Multiple Nuclear Genes. *Syst. Biol.***53**: 533-553.

Strausfeld NJ, Hirth F (2013). Deep homology of arthropod central complex and vertebrate basal ganglia. *Science* **340**: 157-161

Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JLR (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**: 3359-3370.

Temel Y, Blokland A, Steinbusch HWM, Visser-Vandewalle V (2005). The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol* **76**: 393-413

Watson C, Paxinos G, Puelles L (2012). *The Mouse Nervous System*. Elsevier Inc.

Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 182-188.

Xu Q, Tam M, Anderson SA (2008). Fate Mapping Nkx2.1-Lineage Cells in the Mouse Telencephalon. *The Journal of Comparative Neurology* **506**: 16-29.

Yasumi M, Sato K, Shimada S, Nishimura M, Tohyama M (1997). Regional distribution of GABA transporter 1 (GAT1) mRNA in the rat brain: comparison with glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) mRNA localization. *Brain Res Mol Brain Res* **44**: 205-218.

Zhou L, Zhu DY (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* **20**: 223-230.

<https://mayfieldclinic.com/>

<https://mouse.brain-map.org/experiment/show?id=74988460>

<http://rbpmap.technion.ac.il/>

https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

<http://www.ensembl.org/>

8. PRILOZI

Popis priloga:

- 8.1. Sekvenca *Mus musculus* gena Nkx2.1
- 8.2. Sekvenca *Mus musculus* proteina Nkx2.1
- 8.3. Sekvenca *Mus musculus* mRNA transkripta Nkx2.1
- 8.4. Kodirajuća CDS sekvenca *Mus musculus* transkripata Nkx2.1
- 8.5. Sekvence 3' UTR regija transkripata *Mus musculus* gena Nkx2.1
- 8.6. Sekvence 5' UTR regija transkripata *Mus musculus* gena Nkx2.1
- 8.7. Sekvenca *Rattus norvegicus* gena Nkx2.1
- 8.8. Sekvenca *Rattus norvegicus* proteina Nkx2.1
- 8.9. Sekvenca *Rattus norvegicus* mRNA transkripta Nkx2.1
- 8.10. Kodirajuća CDS sekvenca *Rattus norvegicus* transkripata Nkx2.1
- 8.11. Sekvence 3' UTR regija transkripata *Rattus norvegicus* gena Nkx2.1

8.1. Sekvenca *Mus musculus* gena Nkx2.1

>12 dna:chromosome chromosome:GRCm38:12:56531957:56536909:-1

CCTGGTAACAGCAATGAGGCTGACGCCCCGGGCCCGCTAGGGAGCACAGCCCACAGCTCCCCCTT
GCCAGGCGCCCAAGGACCCTCAAGGCGCGGGGCTCACACTTGAAGCCTGGGAACGCTCAGACAGG
AAACCCACTTCCCTCCTAAGCAGTTTCTTCTAGCCGGATGAGAGGCGCCCAATTGAAGCAGAATGA
TCCTCATCTACTAATATCCAGCGTGGCCACAAAGCGACCGGCCATTTACGCCGCACTTTAGACAA
AGATATTTGGTTATTCCCGGGGAAGCAAGTGCACTTTTGCATGGCTGAGCTCCGGGAGGAGGCGAG
CCTCAGCCCAGCCTCCCGCCCGCTGGGCTGCGGGCGTCGAGATATTCGCCTCCTCCCGGACAACGA
GTTCCACCCGGGTTTCAGACTCAGTTCCACTCTGCAACGGATCTGCGGGCGCTCACGCGGCTCCCCG
CCCGGGCTTTCACTGAAGCATCGGAAGGGAAAAGTGCGGGGATCTGAGCTGGGGTGTGGACTG
GGATGTCCTCGGAAAGACAGCATCAGCTTCTGAAGCCGAAGTATCCAGGCCATGGGCAAGGGTCA
GGGGCACCAGGTTTGTTCGAGATGGGGCAACTTCCGTGGTGGACTCTCCTGTTAATCCCCCGCACC
CTTAGCCTCGTAGCTCAGAGGGCCAGCGGTGTACTTGCTGGGCCGGCAAAAGGGGTGGAGAAAG
GGAGCGGCGGGGTGGGGTGGGGTGGGGGGCTGGTCCGCTAGGGAGCCAGGAGCTTGGTGGGGG
GTGGCGCGGGGATCGGTGACAGCCTCCCGGAGGCAGTCGTTCCCTTACTCAGCTCCCCCTCCGCC
GCTGGGATTCTCTCGGGTAAGGGGAAAGGGGGCGGGGAGCAGAGGTGTCCCTCTGACGGCGGGCGG
CAGAAGAAGCAGACAGACTGACAGACACATAGACCAACAGTGCAGCCCCAGGGTTCATCCCCAGA
CTCGCACACTCTTTTGGTGGTACTGGGGCTCAGCGCAGCGAAGCCCGATGTGGTCCGGAGGCGGT
GGGAAGGCGCGGGGCTGGGAGGCCGAGCGGGAGGGAGGAGCAGCCCCGGCAGGCTCAGGTGAA
ATCCCGCTCCCTGCTCCTCAGCCCCCTTCTCCCCAAAGGCCAGCCCCTGACCTCGGAACCCCGACC
AAATTGGACCGCGGTTCCACTTTGTAAGTCCCAAGTTGGTTGCAAAGCAGTATTCACCTTCCGTTT
TCCTTTCCATCCCTCCCTTAGGTTATTCTCTACCCACCTCTGGCCCTCCCGCTCTCGGTTCCCTCC
TCCTTCCCCCCCCCGCCTTTTCTCGCGGCCACAGGCACCCACAAAAATGGGGGTGGGGGTG
TCCAAGGGAGGGGAAAGTAATGCTTTGGTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCTCTCTCTCTCCCTCTCTCCTTCTTTCTCTTTGAGACCTAAAAATCTTGACAAGTGAAGCTTAAA
GGTGTTTACCTTGTATCAGCATGTAAGCTAATTATCTCGGGCAAGATGTAGGCTTCTATTGTCTTG
TTGCTTTAGCGTTATGCCCCGCTCTGGTGGCTGCCTAAACCTGGCGCCGGGCTAAAACAAACG
CGAGGCAGCCCCGAGCCTCCACTCAAGCCAATTAAGGCGGACTCGGTCCACTCCGTTACGTGTAC
ATCCAACAAGATCGGCGTTAAGGTAACACCAGAATATTTGGCAAAGGGAGAAAAAAAAGTAGCG
AGGCTTCGCCTTCCCCCTCTCCCTTTTTTTTTTCTCCTCTCCTTCCCTCCTCCAGCCGACGCCGAATC
ATGTCGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGAA
AGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGCGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCGTACAGACAGGG
CCAGGCGGCCCCACCGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTCACCG
CCGCCTACCACATGACGGCGGGGGGGTGCCTCAGCTCTCGCACTCCGCGTGGGGGGCTACTGCA
ACGGCAACCTGGGCAACATGAGCGAGCTGCCGCCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTCG
GGCCCCGGATGGTACGGCGCAACCCAGACCCGCGCTTCCCCGCCAGTAAGTGAAGCCGCCCCGCC
GCGGGGCCGCGGGCTAAGCACCGGAGGCGCGGTGCGCGCGGCCGCGAGGTGCGGCGCCCCGCCGG
TGGCGCTGGGCATCGGGGTGGGCAGCCGAACAGCCTTGTGTAGGAGTGGGGTGAAGGCACTGGAC
TTTCTTCCCCCGCTGGGCAAGGGTTTCAAAGGAGTACTTAGAAGAGCTGGGGTCTGCGGACAG
GTGCTAGCACCCGACCACCGCAGGCACCAAGGACAGACTTGATGCTCAAGACTTCAGGGAGCTAA
GGAAGGCCACCCGGGACTCGGCTAGGGAGGCTAGGAACTCGGGCCAGAGGAGTTAGGGACCAG
GAGGGGCGAGTAGAGAGAGCCGCCCTGCTGGGATGCATCCCGGTGCGGCTGCCTCGATTTCTAAA
AGTCTCCCTCTGGGTGGCTTGGGAGGGCGCACAGCTCTGGAGGAGGCTCTACGTGGGTGCGGGCGG
TGGCTGTCCTACCTAGAGCCCGCAAGAGAGAAAGCCAGAGAGGCCAAGCGCCTGGAAGCTGGGG
CGTTTGTAAAGTGAAGTCCCTTTTGTAAAGCTCCTGAACTTGGTCTACCGTCCGACCCAGCTCTC
TGCACCCTTGGGTCTCCACCTGGCTTGGGCATGAAAGGAGTCAAAGCAACCCTTTTCCCTCACTGC
ACATTCTGGGTCTAAAGGGACACTGATACCAATGAGGAGTAGCTAGACTTTAAACCCTTAAGTAGT
TCGACGGCACGGCCCGCTAGCTGGGCCTCTTTTGGGAAAGAGCACTAGGCGGCGGCCTAGGTGAG
GAGGATGCCGTCGAAAGTTGGGGCGGGCAGGCCAAGGGCACAGAAAGCGGGGTTGCCCGGCCCC
GGCCCCAGCCGACCGCTGTGCGTTTGTGCTTACAGTCTCCCGCTTCATGGGCCCGGCGAGCGGCA
TGAATATGAGTGGCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACATGGCCCCGCTG

CCCAGTGCGCCCGCCGGAAGCGCCGGGTGCTCTTCTCCCAGGCGCAGGTGTACGAGCTCGAGCGA
CGTTTCAAGCAACAGAAGTACCTGTCTGGCGCCGGAGCGCGAGCATCTGGCCAGCATGATTCACCTG
ACACCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCACCGCTACAAGATGAAGCGCCAGGCTAAGGA
CAAGGCGGCGCAGCAACAAGTGCAGCAGGACAGCGGGCGGCGGAGGGCGGCGGTGGCGGTGCG
GGATGCCCCGAGCAGCAGCAAGTCTAGCAGCAGTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGCCGGTCTAGT
CAAAGACGGCAAACCCTGCCAGGCGGGCGCCCTGCCCCGGGAGCCGCAAGCCTGCAAAGCCACG
CGCAGCAACAAGCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGCGCAAGCGGCTGCCGCGGCCATCTCAGTGGGC
AGCGGTGGCGCGGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCGGGCAGCGCAGGGCAGTCCCCGGA
CCTGGCGCACACGCAGCCAGCCCCGCGGGGCTGCAGGGCCAGGTCTCCAGCCTATCCCATCTGAA
CTCCTCGGGCTCGGACTATGGCGCCATGTCTTGTCTACCTTGCTTTATGGTCTGGACCTGGTGAGAC
GTGAGATGCGCTTGAGCCCCGCGGACCTCAACGCTTCCCCTCTGCCTTCCGCAAAGACCACCATT
CGCCCCTGCTCCACGCGCTTCTACTTTTTTTAAGAATCTGTTTATGTTTAGACCAAGGAAAAGTAC
ACAAAGACCAAAGTCTGGACGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
TTCT
CTCCTCT
TCATCTTCCCCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
AGAAAATAGAAACAGCCAAGCAAATTC AACCTTTACGGATTCTTTAAACAGAGAAGGACAGAGA
ACAAATTTGGGGTGTCTTCTGGTAGTTCAAATGGGTTCCCAAGCTTAGGCATGGCACAGTTTTGGA
GCCTGTTCTATGCTTCCATGGCCCTGAACTCTAAAGACGGAAAATTTTCTGTGGATGCACCCTGCC
AGCAAAGTGAGCTTGCTTGTAATAACCAGGATTTTTCGTTTGTGTTGTATGTTTCAGAAGGGAGGAC
AGACGCTGGAGATAGGAAAGTCTTCAGCATAACCCATTTGTACCTGACACAAAGGAAGTGTCCCCT
CCCAGGCGCCCTCTGGCCCTACAGGTTTCAGTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATGTTTTAGGTTTGA
TGTGAACTTGTAGCTGTAAAATGCTGTAAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAGTAACCTGTAC
ATTATGTTGTAAAAGAACCCAGTCCCAGTCCCTAGTCCCTCACTTTTTCAAGGGGCATTGACAA
ACCTGTGTATATTTGGCAGTTTGGTATTTGCAGACCAATCCTTTTTTTTTTCTGTTGTAACCT
ATGTAGATATTTGGCTTAAATATAGTTCCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTA AAAAAG

8.2. Sekvenca *Mus musculus* proteina Nkx2.1

>sp|P50220|NKX21_MOUSE Homeobox protein Nkx-2.1 OS=Mus musculus OX=10090
GN=Nkx2-1 PE=2 SV=1

MSMSPKHTTTPFSVSDILSPLEESYKKGVMEGGGLGAPLAAYRQGQAAPPAAAMQQHAVGHHGAVTAA
YHMTAAGVPLSHSAVGGYCNGNLGNMSELPPYQDTMRNSASGPGWYGANPDPRFPAISRFMGPASG
MNMSGMGGLGSLGDVSKNMAPLPSAPRRKRRVLFSQAQVYELERRFKQKQKYLAPEREHLASMIHLT
PTQVKIWFQNHRYKMKRQAKDKAAQQQLQQDSGGGGGGGGGAGCPQQQAQQQSPRRVAVPVLVK
DGKPCQAGAPAPGAASLQSHAQQQAQQQAQAAQAAAAAISVGSAGLGAHPGHQPGSAGQSPDLA
HHAASPAGLQGVSSLSHLNSSGSDYGAMSCSTLLYGRTW

8.3. Sekvenca *Mus musculus* mRNA transkripta Nkx2.1

>ENSMUST00000178477.8 Nkx2-1-202 cDNA:protein_coding

TTTTTTTTTCTCCTCTTCCTTCTCCTCCAGCCGACGCCGAATCATGTTCGATGAGTCCAAAGCACA
CGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGAAAGCTACAAGAAAGTGGGCATGG
AGGGCGGCGGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCGTACAGACAGGGCCAGGCGGCCCCACCGGCCGCG
GCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTACCCGCCGCTACCACATGACGGCGGC
GGGGGTGCCCCAGCTCTCGACTCCGCCGTGGGGGGCTACTGCAACGGCAACCTGGGCAACATGA
GCGAGCTGCCGCCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTCGGGCCCCGGATGGTACGGCGCC
AACCCAGACCCGCGCTTCCCCGCCATCTCCCGCTTCATGGGCCCGGCGAGCGGCATGAATATGAGT
GGCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACATGGCCCCGCTGCCCAGTGCGCC
CCGCCGGAAGCGCCGGGTGCTCTTCTCCAGGCGCAGGTGTACGAGCTCGAGCGACGTTTCAAGCA
ACAGAAGTACCTGTCCGCGCCGGAGCGCGAGCATCTGGCCAGCATGATTCACCTGACACCCACGC
AGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCACCGCTACAAGATGAAGCGCCAGGCTAAGGACAAGGCGGCG
CAGCAACAAGTGCAGCAGGACAGCGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGTGGCGGTGCGGGATGCCCGC
AGCAGCAGCAAGCTCAGCAGCAGTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGCCGGTCTAGTCAAAGACGGC
AAACCCTGCCAGGCGGCGGCCCTGCCCGGGAGCCGCAAGCCTGCAAAGCCACGCGCAGCAACA
AGCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGCGCAAGCGGCTGCCGCGGCCATCTCAGTGGGCAGCGGTGGCG
CGGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCGGGAGCGCAGGGCAGTCCCCGGACCTGGCGCAC
CACGCAGCCAGCCCCGCGGGGCTGCAGGGCCAGGTCTCCAGCCTATCCCATCTGAACTCCTCGGGC
TCGGACTATGGCGCCATGTCTTGTCTACCTTGCTTTATGGTTCGGACCTGGTGAGACGTGAGATGCG
CTTGAGCCCCGCGCGACCTCAACGCTTCCCCTCTGCCTTCCGCAAAGACCACCATTCGCCCGCTGCT
CCACGCGTTCTACTTTTTTTAAGAATCTGTTTATGTTTAGACCAAGGAAAAGTACACAAAGACCA
AACTGCTGGACGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
CTT
TCCTTCTTGTCCCCGCTCGTTCTTTTCTTCTCCCCCTCCTCTTCTGTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
CCCCCTCCTTTCTCTTACTATCTAAACTTGCAGACTTTTTGTTTTTTAAACATAAAAAGAAAATAGA
AACAGCCAAGCAAATCAACCCTTACGGATTCTTTAAACAGAGAAGGACAGAGAACAAATTTGG
GGTGTCTTTCTGGTAGTTCAAATGGGTTCCCAAGCTTAGGCATGGCACAGTTTTGGAGCCTGTTCTA
TGCTTCCATGGCCCTGAACTCTAAAGACGGAAAACCTTTCTGTGGATGCACCCTGCCAGCAAAGTG
AGCTTGCTTGTAATAACCAGGATTTTTCGTTTGTGTTGATGTTTTCAGAAGGGAGGACAGACGCTGGA
GATAGGAAAGTCTTCAGCATAACCCATTTGTACCTGACACAAAGGAAGTGTCCCCTCCCAGGCGCC
CTCTGGCCCTACAGTTCCAGTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTGTATGTAACCTG
TAGCTGTAATAATGCTGTTAAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTTAGTAACCTGTACATTATGTTG
AAAAAGAACCCAGTCCCAGTCCCTAGTCCCTACTTTTTCAAGGGCATTGACAAACCTGTGTAT
ATTATTTGGCAGTTTGGTATTTGCAGCACCAATCCTTTTTTTTTTCTGTTGTAACCTATGTAGATAT
TTGGCTTAAATATAGTTCCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTAATAA

>ENSMUST00000001536.8 Nkx2-1-201 cdna:protein_coding

CTGGTAACAGCAATGAGGCTGACGCCCCGGGCGCTAGGGAGCACAGCCCACAGCTCCCCCTTG
CCAGGCGCCAAGGACCCTCAAGGCGGGGGCTCACACTTGAAGCCTGGGAACGCTCAGACAGGA
AACCCACTTCTCCTAAGCAGTTTCTTCTAGCCGGATGAGAGGCGCCAATTGAAGCAGAATGAT
CCTCATCTACTAATATCCAGCGTGGCCACAAAGCGACCGGCCATTTACGCCGCCACTTTAGACAAA
GATATTTGGTTATTTCCGGGGAAGCAAGTGCACCTTTTGCATGGCTGAGCTCCGGGAGGAGGCGAGC
CTCAGCCCAGCCTCCCCCGCTGGGCTGCGGGCGTGCAGATATTGCGCTCCTCCCGGACAACGAG
TTCCACCCGGGTTTCACTGAAAGCATCGGAAGGGAAAAGTGCAGGGGATCTGAGCTGGGGTGCTGGGACTGG
GATGTCCTCGGAAAGACAGCATCAGCTTCTGAAGCCGAAGTATCCAGGCCATGGGCAAGGGTCAG
GGCACCAGCCGACGCCGAATCATGTGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGA
CATTTGAGTCCCCTGGAGGAAAGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGGCCTCGGGGCTC
CGCTCGCAGCGTACAGACAGGGCCAGGCGGCCACCAGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTG
GGCACCACGGCGCCGTACCCGCCCTACCACATGACGGCGGCGGGGGTGCCCCAGCTCTCGCA
CTCCGCCGTGGGGGGCTACTGCAACGGCAACCTGGGCAACATGAGCGAGCTGCCGCCTTACCAGG
ACACCATGCGGAACAGCGCTTCGGGCCCCGGATGGTACGGCGCCAACCCAGACCCGCGCTTCCCCG
CCATCTCCCCGTTTATGGGCCCGGCGAGCGGCATGAATATGAGTGGCATGGGCGGCCTGGGCTCGC
TGGGGGACGTGAGCAAGAACATGGCCCCGCTGCCAGTGCGCCCGCCGGAAGCGCCGGGTGCTC
TTCTCCAGGCGCAGGTGTACGAGCTCGAGCGACGTTTCAAGCAACAGAAGTACCTGTGGCGGCCG
GAGCGCGAGCATCTGGCCAGCATGATTCACCTGACACCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAAC
CACCGCTACAAGATGAAGCGCCAGGCTAAGGACAAGGCGGCGCAGCAACAACCTGCAGCAGGACA
GCGGCGGCGGCGGAGGCGGCGGTGGCGGTGCGGGATGCCCGCAGCAGCAGCAAGCTCAGCAGCA
GTCGCCCGCGCCGGGTGGCCGTGCCGGTCTAGTCAAAGACGGCAAACCTGCCAGGCGGGCGCCC
CTGCCCGGGGAGCCGCAAGCCTGCAAAGCCACGCGCAGCAACAAGCTCAGCAGCAGGCGCAGGGC
GCGCAAGCGGCTGCCGCGGCCATCTCAGTGGGACGCGGTGGCGCGGGTCTAGGAGCACACCCAGG
CCACCAGCCGGGAGCGCAGGGCAGTCCCCGGACCTGGCGCACCACGCAGCCAGCCCCGCGGGGC
TGCAGGGCCAGGTCTCCAGCCTATCCCATCTGAACTCCTCGGGCTCGGACTATGGCGCCATGTCTTG
TTCTACCTTGCTTTATGGTTCGGACCTGGTGTAGACGTGAGATGCGCTTGAGCCCCGCGCGACCTCAA
CGCTTCCCCTCTGCCCTCCGCAAAGACCACCATTCGCCCGCTGCTCCACGCGCTTCTACTTTTTTTAA
GAATCTGTTTATGTTTAGACCAAGGAAAAGTACACAAAGACCAAACCTGCTGGACGACTTCTTCTTC
TTCTT
TTCTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTTCTT
TCTTCTCCCCCTCCTTCTGTTTTCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
AACTTGCAGACTTTTTGTTTTTAAACATAAAAAGAAAATAGAAACAGCCAAGCAAATCAACCCCT
TTACGATTCTTTAAACAGAGAAGGACAGAGAACAATTTGGGGTGTCTTCTGGTAGTTCAAATG
GGTCCCAAGCTTAGGCATGGCACAGTTTTGGAGCCTGTTCTATGCTTCCATGGCCCTGAACTCTAA
AGACGGAAAACCTTTCTGTGGATGCACCCTGCCAGCAAAGTGTAGCTTGCTTGTAATAACCAGGATT
TTTCGTTTGTGTTGATGTTTTCAGAAGGGAGGACAGACGCTGGAGATAGGAAAGTCTTACGCATAAC
CCATTTGTACCTGACACAAAGGAAGTGTCCCCCAGGCGCCCTCTGGCCCTACAGGTTTCACTCC
AGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTGTATGTAAGTGTAGCTGTAAAATGCTGTAAAAG
TTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAGTAACCTGTACATTATGTTGTAAAAGAACCCAGTCCCAGTCC
CTAGTCCCTCACTTTTTCAAGGGGCATTGACAAACCTGTGTATATTATTTGGCAGTTTGGTATTTGC
AGCACCAATCCTTTTTTTTTTCTGTTGTAACCTATGTAGATATTTGGCTTAAATATAGTTTCTAAGA
AGCTTCTAATAAATTATACGAATTAATAA

8.4. Kodirajuća CDS sekvenca *Mus musculus* transkripata Nkx2.1

>Nkx2-1-202 cds:protein_coding

ATGTCGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGAA
AGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGCGGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCGTACAGACAGGG
CCAGGCGGCCCCACCGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTCACCG
CCGCCTACCACATGACGGCGGGCGGGGGTGCCCCAGCTCTCGCACTCCGCCGTGGGGGGTACTGCA
ACGGCAACCTGGGCAACATGAGCGAGCTGCCGCCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTCG
GGCCCCGGATGGTACGGCGCCAACCCAGACCCGCGCTTCCCCGCCATCTCCCGCTTCATGGGCCCCG
GCGAGCGGCATGAATATGAGTGGCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACAT
GGCCCCGCTGCCAGTGCGCCCGCCGGAAGCGCCGGGTGCTCTTCTCCAGGGCGCAGGTGTACGA
GCTCGAGCGACGTTTCAAGCAACAGAAGTACCTGTGCGCGCCGGAGCGCGAGCATCTGGCCAGCA
TGATTCACCTGACACCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCACCGCTACAAGATGAAGCGCC
AGGCTAAGGACAAGGCGGCGCAGCAACAACCTGCAGCAGGACAGCGGGCGGCGGCGGAGGCGGCGG
TGGCGGTGCGGGATGCCCGCAGCAGCAGCAAGCTCAGCAGCAGTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGC
CGGTCCTAGTCAAAGACGGCAAACCCTGCCAGGCGGGCGCCCCTGCCCGGGAGCCGCAAGCCTG
CAAAGCCACGCGCAGCAACAAGCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGGCGCAAGCGGCTGCCGCGGCCAT
CTCAGTGGGCAGCGGTGGCGCGGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCGGGCAGCGCAGGGC
AGTCCCCGGACCTGGGCGACACGCAGCCAGCCCCGCGGGGCTGCAGGGCCAGGTCTCCAGCCTAT
CCCATCTGAACCTCTCGGGCTCGGACTATGGCGCCATGTCTTGTCTACCTTGCTTTATGGTCGGAC
CTGGTGA

>Nkx2-1-201 cds:protein_coding

ATGTCGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGAA
AGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGCGGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCGTACAGACAGGG
CCAGGCGGCCCCACCGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTCACCG
CCGCCTACCACATGACGGCGGGCGGGGGTGCCCCAGCTCTCGCACTCCGCCGTGGGGGGTACTGCA
ACGGCAACCTGGGCAACATGAGCGAGCTGCCGCCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTCG
GGCCCCGGATGGTACGGCGCCAACCCAGACCCGCGCTTCCCCGCCATCTCCCGCTTCATGGGCCCCG
GCGAGCGGCATGAATATGAGTGGCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACAT
GGCCCCGCTGCCAGTGCGCCCGCCGGAAGCGCCGGGTGCTCTTCTCCAGGGCGCAGGTGTACGA
GCTCGAGCGACGTTTCAAGCAACAGAAGTACCTGTGCGCGCCGGAGCGCGAGCATCTGGCCAGCA
TGATTCACCTGACACCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCACCGCTACAAGATGAAGCGCC
AGGCTAAGGACAAGGCGGCGCAGCAACAACCTGCAGCAGGACAGCGGGCGGCGGCGGAGGCGGCGG
TGGCGGTGCGGGATGCCCGCAGCAGCAGCAAGCTCAGCAGCAGTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGC
CGGTCCTAGTCAAAGACGGCAAACCCTGCCAGGCGGGCGCCCCTGCCCGGGAGCCGCAAGCCTG
CAAAGCCACGCGCAGCAACAAGCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGGCGCAAGCGGCTGCCGCGGCCAT
CTCAGTGGGCAGCGGTGGCGCGGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCGGGCAGCGCAGGGC
AGTCCCCGGACCTGGGCGACACGCAGCCAGCCCCGCGGGGCTGCAGGGCCAGGTCTCCAGCCTAT
CCCATCTGAACCTCTCGGGCTCGGACTATGGCGCCATGTCTTGTCTACCTTGCTTTATGGTCGGAC
CTGGTGA

8.5. Sekvence 3' UTR regija transkripata *Mus musculus* gena Nkx2.1

>Nkx2-1-202 utr3:protein_coding

```
GACGTGAGATGCGCTTGAGCCCCGCGCGACCTCAACGCTTCCCCTCTGCCTTCCGCAAAGACCACC
ATTCGCCCCGCTGCTCCACGCGCTTCTACTTTTTTAAGAATCTGTTTATGTTTAGACCAAGGAAAAG
TACACAAAGACCAAAGCTGCTGGACGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTC
TTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTC
CTCCTCCTCCTCCTCCTTCTTGTCCCCGCTCGTTCTTTTTCTTCTCCCCCTCCTCTTCTGTTTCCTTCTT
CCTTCATCTTTCCCCCTTCCTTTCTCTTTACTATCTAAAACCTTGCAGACTTTTTGTTTTTTAACATAA
AAAGAAAATAGAAACAGCCAAGCAAATTCAACCCTTTACGGATTCTTTAAACAGAGAAGGACAGA
GAACAAATTTGGGGTGTCTTTCTGGTAGTTCAAATGGGTTCCCAAGCTTAGGCATGGCACAGTTTTG
GAGCCTGTTCTATGCTTCCATGGCCCTGAACTCTAAAGACGGAAAACCTTTTCTGTGGATGCACCCTG
CCAGCAAAGTGAGCTTGCTTGTAATAACCAGGATTTTTCGTTTGTGTTGTATGTTTCAGAAGGGAGGA
CAGACGCTGGAGATAGGAAAGTCTTCAGCATAACCCATTTGTACCTGACACAAAGGAAGTGTCCCC
TCCCAGGCGCCCTCTGGCCCTACAGGTTCAAGTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTG
ATGTGAACTTGTAGCTGTAAAATGCTGTGTTAAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAGTAACCTGTA
CATTATGTTGTAAAAAGAACCCCAAGTCCCAGTCCCTAGTCCCTCACTTTTTCAAGGGGCATTGACAA
ACCTGTGTATATTATTTGGCAGTTTGGTATTTGCAGCACCAATCCTTTTTTTTTTTCTGTTGTAACCTT
ATGTAGATATTTGGCTTAAATATAGTTCCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTAAAAAA
```

>Nkx2-1-201 utr3:protein_coding

```
GACGTGAGATGCGCTTGAGCCCCGCGCGACCTCAACGCTTCCCCTCTGCCTTCCGCAAAGACCACC
ATTCGCCCCGCTGCTCCACGCGCTTCTACTTTTTTAAGAATCTGTTTATGTTTAGACCAAGGAAAAG
TACACAAAGACCAAAGCTGCTGGACGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTC
TTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTC
CTCCTCCTCCTCCTCCTTCTTGTCCCCGCTCGTTCTTTTTCTTCTCCCCCTCCTCTTCTGTTTCCTTCTT
CCTTCATCTTTCCCCCTTCCTTTCTCTTTACTATCTAAAACCTTGCAGACTTTTTGTTTTTTAACATAA
AAAGAAAATAGAAACAGCCAAGCAAATTCAACCCTTTACGGATTCTTTAAACAGAGAAGGACAGA
GAACAAATTTGGGGTGTCTTTCTGGTAGTTCAAATGGGTTCCCAAGCTTAGGCATGGCACAGTTTTG
GAGCCTGTTCTATGCTTCCATGGCCCTGAACTCTAAAGACGGAAAACCTTTTCTGTGGATGCACCCTG
CCAGCAAAGTGAGCTTGCTTGTAATAACCAGGATTTTTCGTTTGTGTTGTATGTTTCAGAAGGGAGGA
CAGACGCTGGAGATAGGAAAGTCTTCAGCATAACCCATTTGTACCTGACACAAAGGAAGTGTCCCC
TCCCAGGCGCCCTCTGGCCCTACAGGTTCAAGTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTG
ATGTGAACTTGTAGCTGTAAAATGCTGTGTTAAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAGTAACCTGTA
CATTATGTTGTAAAAAGAACCCCAAGTCCCAGTCCCTAGTCCCTCACTTTTTCAAGGGGCATTGACAA
ACCTGTGTATATTATTTGGCAGTTTGGTATTTGCAGCACCAATCCTTTTTTTTTTTCTGTTGTAACCTT
ATGTAGATATTTGGCTTAAATATAGTTCCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTAAAAAA
```

8.6. Sekvence 5' UTR regija transkripata *Mus musculus* gena Nkx2.1

>Nkx2-1-202 utr5:protein_coding

TTTTTTTTTTCTCCTCTTCCTTCCTCCTCCAGCCGACGCCGAATC

>Nkx2-1-201 utr5:protein_coding

CTGGTAACAGCAATGAGGCTGACGCCCCGGGCCCCTAGGGAGCACAGCCCACAGCTCCCCCTTG
CCAGGCGCCCAAGGACCCTCAAGGCGCGGGGCTCACACTTGAAGCCTGGGAACGCTCAGACAGGA
AACCCACTTCCTCCTAAGCAGTTTCTTCTAGCCGGATGAGAGGCGCCCAATTGAAGCAGAATGAT
CCTCATCTACTAATATCCAGCGTGGCCACAAAGCGACCGGCCATTTACGCCGCCACTTTAGACAAA
GATATTTGGTTATTCCTGGGGAAGCAAGTGCACCTTTTGCATGGCTGAGCTCCGGGAGGAGGCGAGC
CTCAGCCCAGCCTCCCGCCCGCTGGGCTGCGGGCGTCGAGATATTCGCCTCCTCCCGGACAACGAG
TTCCACCCGGGTTTCAGACTCAGTTCCACTCTGCAACGGATCTGCGGGCGCTCACGCGGCTCCCCGC
CCGGGCTTTACTGAAGCATCGGAAGGGAAAAGTGCAGGGGATCTGAGCTGGGGTGCTGGGACTGG
GATGTCCTCGGAAAGACAGCATCAGCTTCTGAAGCCGAAGTATCCAGGCCATGGGCAAGGGTCAG
GGCACCAGCCGACGCCGAATC

8.7. Sekvenca *Rattus norvegicus* gena Nkx2.1

>6 dna:chromosome chromosome:Rnor_6.0:6:77418095:77421287:-1

CATGTCGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGA
AAGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCTTACAGACAGG
GCCAGGCGGCCCCGCCGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTACC
GCCGCCTACCACATGACGGCGGGGGTGGCCAGCTCTCCACTCCGCGTGGGGGGGCTACTGC
AACGGCAACCTGGGCAACGTGAGCGAGCTGCCACCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTC
GGGCCCCGGATGGTACGGCGCCAACCCAGATCCGCGCTTCCCCGCCAGTAAGTGAGGCCACCCCGC
CGCGGGGCCACGGGCCGAGACCCGGAGGCGCGGTACGCGCGGCCCGCTAGGTGCGGGCGCCGCCA
GTTGCACTAGGCATCGGGGTGGGCAGCCGAACAGTCTCCTATAGGAGTGGGGTGGGGCGCTGGA
CTTTCTTCGTCCCCTGGGCAAGGGTTTCAAATGAGGCACTTAGAAGAGCTGGGGTCTGCGGACA
GGTGCTGGCACCCGGCCACTGCAGGCGCCAACAACAGGCTTGATGCTGAAGACTTCAGGGAGCTG
AGGGAAGCCACCCGGAGTTAGGGGCTCGGGCCACAGGAGTTAGAGGAGACCAGGAGGGACAAG
TAGAGAGAGCCGCTCTGCTGGGACGCATCCCGGCCCGGCTGCCTGGATTTCTAAAAATCTCTGGGC
GGTTGGGTGGGCTCTAAATGGGTGCGGGCGGATGGGTGCCCTCACCTAGAGCTCGCAAGAGAGAA
AAACGAGAGGCCGAGCGCCTGGAAGTTGGGGACGTTTGAAAGTGAAAACCTCCCTTTTGCTAAGCTC
CTGAAGTTGGGGTCTACCTTCCCACCCAGCTCTCTGCACCCCTGGGTTTCCCACCTGGCTTGGGC
ACGAAAGGAGCCGAAGCGCCCTTTTCCCTCACTGCACATTCTGGGTCTAGAGACTGACACCGAT
GAGGAGTAGCTAGACTTGAACCCCTTAAGCAGTTTCGACGGCACGGCCCGGAGAAGGCACTAGCCA
CTCCCCAGCTAGCTGAGCCTCTTTCGGGGAAAGAGCACTGGGTGGCCTAGGTGAGGAGGATGTCGT
CGAAAATTGGGGTTGGCGGGCCAAGGGCACAGAAACCGGGCTTGCCTGGCCTCGCCCCAGCCG
ACGCTGTGCGTTTGTGCTTACAGTCTCCCGCTTCATGGGCCCCGGCGAGCGGCATGAATATGAGCG
GCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACATGGCCCCGCTGCCAGCGCACCC
CGCCGGAAGCGTCGGGTGCTCTTCTCCAGGCGCAGGTGTACGAGCTCGAGCGACGCTTCAAGCAG
CAGAAGTACCTGTGCGCGCCGGAGCGGAGCATCTGGCCAGCATGATTACCTGACACCCACGCA
GGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCACCGCTACAAGATGAAGCGCCAGGCGAAGGACAAGGCGGGCGC
AGCAGCAACTGCAGCAGGACAGCGGGCGGGCGGAGGCGGGCGGGCGGGGTTGCCGCA
GCAGCAGCAAGCTCAGCAGCAGTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGCCGGTCTGGTGAAGACGGCA
AACCCTGCCAAGCGGGCGCCCCTGCACCCGGGAGCCGCCAGCCTGCAAGGCCACGCGCAACAACAA
GCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGCACAAGCGGCTGCCGCGGCCATCTCTGTGGGCAGCGGTGGTGC
GGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCCAGCGCAGGGCAGTCCCCGGACCTGGCGCACCC
ACGCAGCCAGCCCCGAGCGCTGCAGGGCCAGGTCTTAGCCTATCTCATCTGAACTCCTCTGGCT
CGGACTATGGCGCCATGTCTTGCTCTACTTTGCTTTATGGTCGGACCTGGTGAGATGTGGGACGCGC
CTGAGCCCTGTGCGACCTCACCGCTTCCCTCTACCCTCCGCAAAGACCACCATTCGCCCGCTGCTC
CACGCCCTTCTACTTTTTTCTCATGTTTAGACCAAGGAAAAGTACACAAAGACCAAACCTGCTGGAC
TCCTT
CTT
TGCTT
CCACTCCTCCTTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
TTCTT
AATCCAACCCCTTACGAATCTTTAACCAGAGAAGGACAAAGAACAATTTGGGGTCTTTCTG
TAGTTCAAATGGGTTCTCAAGCTTAGGCATGGCACAATTTGGGGCCTGCTCTATGCTTCCACGGCC
CTGAACTCTGAAGCCGGAACCTCCCTGTGGATGCACTCTGCCAGCAAAGAGAGCTTGCTTGTA
ATACCAGGATTTTTCGTTTGTGTTTTCAGAAAGGGAGGACAGAAACTGGAGAGAGGAAAGATTCTT
CAGCATAACCCACTTGTCCCTGACACAAAGGAAGTGTCCCCTCCAGGTGCCCTCTGGCCCTATAG
GTTCAAGTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTGTATGTGAACCTGTAGCTGTA
TGTCAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAACTGTACATTATGTTGTAAGAAAGAACTCCA
GTCCAGTCCCTGGCCCTCACTTTTTAAAGGGCATCATGGACAAGCCTGTGTATATTACTCCAG
GTTTGGTATTTGCAGCACCAGTTGCCCCCTCCCTTTTTTCTGTTGTAACCTATGTAGATATTTGGCTT
AAATATAGTTCCCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTTAAAAGATGCTTTTTCTGATTA
AAACCCCTTTTTCTTTTTG

8.8. Sekvenca *Rattus norvegicus* proteina Nkx2.1

>tr|G3V740|G3V740_RAT Homeobox protein Nkx-2.1 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Nkx2-1 PE=1 SV=1

MSMSPKHTTFFSVSDILSPLEESYKKVGMEGGGLGAPLAAYRQGQAAPPAAAMQQHAVGHHGAVTAA
YHMTAAGVPQLSHSAVGGYCNGNLGNVSELPPYQDTMRNSASGPGWYGANPDPRFPAISRFGMPASG
MNMSGMGGLGSLGDVSKNMAPLPSAPRRKRRVLFSAQVYELERRFKQQKYLAPEREHLASMIHLT
PTQVKIWFQNHRYKMKRQAKDKAAQQQLQQDSGGGGGGGGGAGCPQQQQAQQQSPRRVAVPVLVK
DGKPCQAGAPAPGAASLQGHAAQQQAQQQAQAAAAAISVSGGAGLGAHPGHQPGSAGQSPDLA
HHAASPAALQGQVSSLNSSGSDYGAMSCSTLLYGRTW

8.9. Sekvenca *Rattus norvegicus* mRNA transkripta Nkx2.1

>ENSRNOT00000011453.5 Nkx2-1-201 cdna:protein_coding

ATGTCGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGAA
AGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGCGGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCTTACAGACAGGG
CCAGGCGGCCCGCCGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTCACCG
CCGCCTACCACATGACGGCGGCGGGGGTGCCCCAGCTCTCCCACTCCGCGGTGGGGGGCTACTGCA
ACGGCAACCTGGGCAACGTGAGCGAGCTGCCACCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTCG
GGCCCCGATGGTACGGCGCAACCCAGATCCGCGCTTCCCCGCCATCTCCCGCTTCATGGGCCCCG
GCGAGCGGCATGAATATGAGCGGCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACAT
GGCCCCGCTGCCAGCGCACCCCCCGGAAGCGTCCGGGTGCTCTTCTCCAGGCGCAGGTGTACGA
GCTCGAGCGACGCTTCAAGCAGCAGAAGTACCTGTCCGGCGCCGGAGCGCGAGCATCTGGCCAGCA
TGATTCACCTGACACCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCAGAACCCGCTACAAGATGAAGCGCC
AGGCGAAGGACAAGGCGGCGCAGCAGCAACTGCAGCAGGACAGCGGCGGCGGCGGAGGCGGCGG
CGGCGGCGGCGGGTTGCCCGCAGCAGCAGCAAGCTCAGCAGCAGTCCCGCGCCGGGTGGCCGTGC
CGGTCCTGGTGAAAGACGGCAAACCCTGCCAAGCGGGCGCCCCTGCACCGGGAGCCGCCAGCCTG
CAAGGCCACGCGCAACAACAAGCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGCACAAGCGGCTGCCGCGGCCAT
CTCTGTGGGCAGCGGTGGTGCGGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCCCGCGCAGCGCAGGGC
AGTCCCCGGACCTGGCGCACCCAGCAGCCAGCCCCGAGCGCTGCAGGGCCAGGTCTCTAGCCTAT
CTCATCTGAACCTCTGGCTCGGACTATGGCGCCATGTCTTGCTCTACTTTGCTTTATGGTCCGAC
CTGGTGAGATGTGGGACGCGCCTGAGCCCTGTGCGACCTACCGCTTTCCTCTACCCTCCGCAAA
GACCACCATTCGCCCCGCTGCTCCACGCCCTTCTACTTTTTCTCATGTTTAGACCAAGGAAAAGTAC
ACAAAGACCAAACCTGCTGGACTCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
TTCT
TCTT
CTTCT
TCTT
TCCTTCATCCTTCTCCCTTTCCTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
GAAAATAGAAACAGTCAAGCAAATCCAACCCTTTACGAATCTTTAACCAGAGAAGGACAAAGA
ACAAATTTGGGGGTCTTTCTGGTAGTTCAAATGGGTTCTCAAGCTTAGGCATGGCACAAATTTGGG
GCCTGCTCTATGCTTCCACGGCCCTGAACTCTGAAGCCGGAACCTTCCCTGTGGATGCACTCTGCC
AGCAAAGAGAGCTTGCTTGTAATAACCAGGATTTTTCGTTTTGTTTGTTCAGAAAGGGAGGACAGAA
ACTGGAGAGAGGAAAGATTCTTCAGCATAACCCACTTGTCCCTGACACAAAGGAAGTGTCCCTCC
CAGGTGCCCTCTGGCCCTATAGGTTCAAGTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTGATG
TGAACCTGTAGCTGTAAAATGCTGTCAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAGTAACCTGTACAT
TATGTTGTAAAAGAAGCTCCAGTCCAGTCCCTGGCCCTCACTTTTTAAAGGGCATCATGGACA
AGCCTGTGTATATACTCCACGGTTTTGGTATTTGCAGCACCAGTTGCCCCCTCCCTTTTTTCTGTTGT
AACTTATGTAGATATTTGGCTTAAATATAGTTCCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTTAA
AAGATGCTTTTTCTGATTAACCCCTTTTTCTTTTT

8.10. Kodirajuća CDS sekvenca *Rattus norvegicus* transkripta Nkx2.1

>Nkx2-1-201 cds:protein_coding

ATGTCGATGAGTCCAAAGCACACGACTCCGTTCTCAGTGTCTGACATCTTGAGTCCCCTGGAGGAA
AGCTACAAGAAAGTGGGCATGGAGGGCGGCGGCCTCGGGGCTCCGCTCGCAGCTTACAGACAGGG
CCAGGCGGCCCCGCCGGCCGCGGCCATGCAGCAGCACGCCGTGGGGCACCACGGCGCCGTCACCG
CCGCCTACCACATGACGGCGGGGGGGTGCCCCAGCTCTCCCACTCCGCCGTGGGGGGCTACTGCA
ACGGCAACCTGGGCAACGTGAGCGAGCTGCCACCTTACCAGGACACCATGCGGAACAGCGCTTCG
GGCCCCGGATGGTACGGCGCCAACCCAGATCCGCGCTTCCCCGCCATCTCCCGCTTCATGGGCCCCG
GCGAGCGGCATGAATATGAGCGGCATGGGCGGCCTGGGCTCGCTGGGGGACGTGAGCAAGAACAT
GGCCCCGCTGCCAGCGCACCCCCCGGAAGCGTCCGGTGTCTTCTCCAGGGCGCAGGTGTACGA
GCTCGAGCGACGCTTCAAGCAGCAGAAGTACCTGTGCGCGCCGGAGCGCGAGCATCTGGCCAGCA
TGATTCACCTGACACCCACGCAGGTCAAGATCTGGTTCCAGAACCACCGCTACAAGATGAAGCGCC
AGGCGAAGGACAAGGCGGCGCAGCAGCAACTGCAGCAGGACAGCGGGCGGCGGCGGAGGCGGGCGG
CGGCGGCGGGGTTGCCCGCAGCAGCAGCAAGCTCAGCAGCAGTCGCCGCGCCGGGTGGCCGTGC
CGGTCCTGGTGAAAGACGGCAAACCCTGCCAAGCGGGCGCCCCTGCACCGGGAGCCGCCAGCCTG
CAAGGCCACGCGCAACAACAAGCTCAGCAGCAGGCGCAGGCGGCACAAGCGGCTGCCGCGGCCAT
CTCTGTGGGCAGCGGTGGTGCGGGTCTAGGAGCACACCCAGGCCACCAGCCCAGCGCAGGGC
AGTCCCCGGACCTGGGCGACCACGCAGCCAGCCCCGAGCGCTGCAGGGCCAGGTCTCTAGCCTAT
CTCATCTGAACCTCTGGCTCGGACTATGGCGCCATGTCTTGCTCTACTTTGCTTTATGGTCGGAC
CTGGTGA

8.11. Sekvence 3' UTR regija transkripta *Rattus norvegicus* gena Nkx2.1

>Nkx2-1-201 utr3:protein_coding

GATGTGGGACGCGCCTGAGCCCTGTGCGACCTCACCGCTTCCCTCTACCCTCCGCAAAGACCACC
ATTGCCCCGCTGCTCCACGCCCTTCTACTTTTTTCTCATGTTAGACCAAGGAAAAGTACACAAAGA
CCAAACTGCTGGACTCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
CTT
TCCTTCTTCTTTTTCTGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
TTTTTCTCCTTGTCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
CCTTCTCCCTTTCCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
GAAACAGTCAAGCAAATCCAACCCCTTACGAATCTTTAACCAGAGAAGGACAAAGAACAATT
TGGGGGTCTTCTGGTAGTTCAAATGGGTTCTCAAGCTTAGGCATGGCACAATTTGGGGCCTGCTC
TATGCTTCCACGGCCCTGAACTCTGAAGCCGGAAGTCCCTGTGGATGCACTCTGCCAGCAAAG
AGAGCTTGCTTGTAATAACCAGGATTTTTCGTTTTGTTTGTTCAGAAGGGAGGACAGAACTGGAG
AGAGGAAAGATTCTTCAGCATAACCCACTTGTCCCTGACACAAAGGAAGTGTCCCTCCCAGGTGC
CCTCTGGCCCTATAGGTTCACTCCAGGCTGGCCTTTCAGAAAATTGTTTTAGGTTTGATGTGAACTT
GTAGCTGTAAAATGCTGTCAAAGTTGGACTAAATGCCTAGTTTTTAGTAACCTGTACATTATGTTG
TAAAAAGAACTCCAGTCCAGTCCCTGGCCCTCACTTTTTAAAAGGGCATCATGGACAAGCCTGT
GTATATTACTCCACGGTTTTGGTATTTGCAGCACCAGTTGCCCCCTCCCTTTTTTCTGTTGTAACCTAT
GTAGATATTTGGCTTAAATATAGTTCTAAGAAGCTTCTAATAAATTATACGAATTTAAAAGATG
CTTTTTCTGATTAACCCCTTTTTCTTTTT

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Tila Medenica

Datum rođenja: 10.3.1995.

Mjesto rođenja: Našice, Hrvatska

Adresa prebivališta: Ulica Matice hrvatske 14, 33515 Orahovica

E-mail: tilamedenica@gmail.com

Vozačka dozvola: B

Obrazovanje

2016. – danas Sveučilišni diplomski studij Molekularne biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018. Master Programme Translational Neuroscience, Heinrich-Heine-University Düsseldorf (ERASMUS studijski boravak)

2016. Speleološka škola, Speleološki odsjek, Hrvatsko planinarsko društvo Željezničar (speleolog pripravnik)

2013. - 2016. Sveučilišni preddiplomski studij Molekularne biologije, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (sveučilišna prvostupnica molekularne biologije)

Završni rad: „Molekularna osnova socijalno-reproduktivnih ponašanja“

Mentor: doc.dr.sc. Duje Lisičić

2009. - 2013. Opća gimnazija, Srednja škola Stjepana Ivšića, Orahovica

2001. – 2009. Osnovna škola Ivane Brlić-Mažuranić, Orahovica

Tečajevi

2019. NGSchool (Summer School in Bioinformatics & NGS Data Analysis) 2019: Machine Learning for Biomedicine, Biało-brzegi, Poljska

2019. Tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama, A Kategorija, Broj potvrde: 125.2-19, HR 191/02/P

Članstva

2017. – danas Urednički odbor časopisa Speleolog
2016. – danas Hrvatsko planinarsko društvo Željezničar, Speleološki odsjek
2014. – 2018. Udruga studenata biologije BIUS (voditeljica Sekcije za sisavce)

Projekti

2018. Edukacijski projekt "Mala škola mamalogije u Gorskom kotaru 2018." Udruge studenata biologije - BIUS (organizator)
2017. Edukacijski projekt "Mala škola mamalogije u Gorskom kotaru 2017." Udruge studenata biologije - BIUS (organizator)
2017. Istraživačko-edukacijski projekt "Insula Tilagus 2017." Udruge studenata biologije - BIUS (sudionik)
2016. Istraživačko-edukacijski projekt "Mura-Drava 2016." Udruge studenata biologije - BIUS (sudionik)
2015. Istraživačko-edukacijski projekt "Papuk 2015." Udruge studenata biologije - BIUS (sudionik)
2014. Istraživačko-edukacijski projekt "Grabovača 2014." Udruge studenata biologije - BIUS (sudionik)

Nagrade

2015. Posebna Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagrebu 2014./2015. za Istraživačko-edukacijski projekt "Grabovača 2014." Udruge studenata biologije – BIUS

Konferencije

2019. VII. Hrvatski kongres neuroznanosti, Zadar, Hrvatska
2015. ICEB - International Conference on Evolution and Behaviour, Zagreb, Hrvatska
2014. ICEB - International Conference on Evolution and Behaviour, Zagreb, Hrvatska

Publikacije

Bokulić E., Medenica, T., Sedmak, G. Do subthalamic and substantia nigra neurons share common neuronal lineage? Hrvatski kongres neuroznanosti, Zadar, Hrvatska, 2019., str. 39-39.

Medenica, T., Štulić, A. Istraživanje faune sisavaca Dugog otoka, Zbornik istraživačkih radova Udruge studenata biologije - BIUS „Insula Tilagus 2017.“, Zagreb, Hrvatska, 2019., str. 218-223.